

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow-Klinikum

DISSERTATION

**Beeinflussung der Apoptoserate und  
Zellzyklusprogression humaner T-Zellen  
durch den probiotischen E. coli Stamm  
Nissle 1917**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -  
Universitätsmedizin Berlin

von  
Klaus Rilling  
aus Hamburg

**Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul**

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Dignass  
2. Prof. Dr. med. Dr. oec. Troph. J. Stein  
3. Priv.-Doz. Dr. med. J. Gschossmann

Datum der Promotion: 27. 1. 2006

## **Zusammenfassung**

Einleitung: Das Probiotikum E. coli Nissle 1917 (EcN) wird seit einigen Jahren erfolgreich in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen angewendet, der zugrunde liegende Wirkmechanismus ist jedoch nur unzureichend geklärt. T-Zellen spielen in der intestinalen Immunhomöostase und der Pathogenese von CED eine zentrale Rolle. Ziel: Den Einfluss von EcN auf humane T-Zellen weitergehend zu charakterisieren. Methoden: CD3-stimulierte periphere und Lamina propria T-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen eines E. coli Nissle 1917 konditionierten Mediums (EcN-CM) oder aber hitzeinaktivierten E. coli Nissle 1917 (hi-EcN) kultiviert. Die Expression von zellzyklus- und apoptoseassoziierten Regulationsproteinen sowie DNA-Gehalt, Zellzykluskinetik, Apoptoserate und Zellexpansion wurden durchflusszytometrisch und im Western Blot bestimmt. Die Sekretion von Cytokinen wurde mit dem Cytometric Bead Assay bestimmt. Ergebnisse: EcN-CM, nicht aber hitzeinaktivierte E. coli Nissle 1917 hemmt die Zellzyklusprogression und die Expansion von stimulierten, humanen peripheren T-Zellen. Ursächlich hierfür ist eine verminderte Expression der Cykline A, B1, D2 und E mit einer konsekutiv verminderten Phosphorylierung des Retinoblastomproteins. Periphere T-Zellen sezernieren unter EcN-CM vermindert IL-2, IFN-gamma und TNF-alpha, während die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 durch EcN-CM heraufreguliert wird. Im Gegensatz zur potenten Beeinflussung des Zellzyklus, wurde die Apoptose von PBT durch E. coli Nissle 1917 nicht moduliert. Während periphere T-Zellen durch EcN-CM in ihrer Zellzyklusprogression und Expansion gehemmt wurden, zeigte sich kein derartiger Effekt auf ortständige Lamina propria T-Lymphozyten. Diskussion: Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung von peripheren T-Zellen in die intestinale Mukosa. Durch die differenzielle Beeinflussung des Immunsystems, bei der aktivierte periphere T-Zellen inhibiert, die ortsständigen T-Zellen jedoch in ihrer Funktion nicht gestört werden, könnte E. coli Nissle 1917 dazu beitragen, die mukosale Entzündungsreaktion zu limitieren, während die intestinale Immunhomöostase gewahrt bleibt. Als wirksames Agens kommen kleine, hitzestabile bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide, bakterielle Lipoproteine, CPG-DNA, Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane in Frage. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern weitere Hinweise, dass Probiotika einen breiten Einfluss auf das humane Immunsystem haben und decken zugrundeliegende Mechanismen auf.

## **Schlagworte:**

Chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Escherichia coli Nissle 1917, Probiotika, T-Zellen, Apoptose, Zellzyklus

## **Abstract**

**Introduction:** Although probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 (EcN) has been proven to be efficacious for the treatment of inflammatory bowel diseases, the underlying mechanisms of action still remain elusive. T cells play a major role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. **Aims:** To analyze the effects of *E. coli* Nissle 1917 on cell cycling and apoptosis of peripheral blood and lamina propria T cells. **Methods:** Anti-CD3-stimulated peripheral or lamina propria T cells were treated with *E. coli* Nissle 1917-conditioned medium (EcN-CM) or heat-inactivated *E. coli* Nissle 1917. Expression of cell cycle or apoptosis related proteins was determined by immunoblotting, DNA content, cell cycle kinetics, cell expansion and apoptosis were measured by flow cytometry. Cytokine levels in culture supernatants were assessed by cytometric bead array. **Results:** EcN-CM but not heat-inactivated EcN inhibits cell cycling and expansion of peripheral T cells. EcN-CM decreases expression of Cyclin A, B1, D2 and E and thus reduces phosphorylation of retinoblastoma protein in CD3-stimulated peripheral T cells. Further, secretion of proinflammatory cytokines IL-2, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  is reduced while antiinflammatory IL-10 is increased under treatment with EcN-CM. In contrast to peripheral T cells, expansion and cell cycle progression of lamina propria T cells was not affected by EcN-CM. Apoptosis of was not modulated by EcN-CM. **Discussion:** The differential reaction of circulating and tissue-bound T cells towards *E. coli* Nissle 1917 may explain the beneficial effect of EcN in intestinal inflammation. EcN may downregulate the expansion of newly recruited T cells into the mucosa and thus limit intestinal inflammation, while already activated tissue-bound T cells may eliminate deleterious antigens in order to maintain immunological homeostasis. Possible agents, for which immunomodulatory effects are known, include heat-stable bacterial products like lipopolysaccharids, bacterial lipoproteins or bacterial DNA-motifs.

## **Keywords:**

Inflammatory bowel disease, Crohn's disease, ulcerative colitis, *Escherichia coli* Nissle 1917, probiotics, T cells, apoptosis, cell cycle

# INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen .....	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Chronisch entzündliche Darmerkrankungen .....	8
1.2 Probiotika .....	11
1.3 Escherichia coli Stamm Nissle 1917 .....	17
1.4 Das mukosale Immunsystem und Lamina propria T-Zellen .....	19
1.5 Aufgabenstellung.....	22
2 Material und Methoden.....	23
2.1 Antikörper und Reagenzien.....	23
2.2 Zellpräparation .....	27
2.3 Präparation von Bakterienkulturen .....	29
2.4 Zellkultur.....	30
2.5 Zellfixierung.....	31
2.6 Proteinextraktion .....	31
2.7 Protokolle für die Durchflusszytometrie .....	32
2.8 Western Blot Analyse .....	36
3 Ergebnisse .....	38
3.1 Einfluss von EcN auf die Zellzyklusprogression von PBT .....	38
3.2 Modulation von Zellzyklusregulatoren durch EcN.....	40
3.3 Einfluss von E. coli Nissle 1917 auf den Zelltod von PBT .....	45
3.4 Modulation der Expansion von peripheren T-Zellen .....	47
3.5 Einfluss von E. coli Nissle 1917 auf die Apoptose, Zellzyklusverteilung und Expansion von Lamina propria T-Zellen und andere T-Zell Subpopulationen.....	48
3.6 Modulation der Zytokinsekretion durch EcN .....	52
3.7 Wirkung von nicht probiotischen E. coli Stämmen und Bakterienbestandteilen auf den Zellzyklus von peripheren T-Zellen. ....	54

4	Diskussion .....	57
4.1	Immunmodulation durch EcN und andere Probiotika .....	57
4.2	Regulation von Zellzyklusmediatoren durch EcN .....	59
4.3	Beeinflussung der Apoptoserate bei CED .....	60
4.4	Distinkte Zellzyklusregulation durch EcN in PBT und LPT .....	63
4.5	Modulation der Zytokinsekretion durch EcN .....	65
4.6	Wirksame Faktoren in bakteriellen Kulturüberständen .....	66
4.7	Spezifität des Immunmodulatorischen Effektes von EcN .....	68
4.8	Zusammenfassung und Ausblick.....	69
5	Literaturverzeichnis .....	71
6	Veröffentlichungen.....	88
	Lebenslauf .....	89
	Danksagung .....	91
	Erklärung an Eides Statt.....	92

# ABKÜRZUNGEN

5-ASA	5-Aminosalizylsäure
BLP	bakterielles Lipoprotein
BrdU	Bromdesoxyuridin
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester
CM	konditioniertes Medium
CU	Colitis Ulcerosa
Cpg-DNA	bakterielle DNA-Motive
EcN	Escherischia coli Stamm Nissle 1917
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
GALT	Darmassoziiertes Immunsystem
Hi-EcN	hitzeinaktivierte EcN
IFN- $\gamma$	Interferon $\gamma$
LPMC	Lamina propria mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
LPT	Lamina propria T-Zellen
MACS	magnetisches Zellsortiersystem
MC	Morbus Crohn
PAMP	<i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	periphere Blut-mononukleäre Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBT	Periphere Blut-T-Zellen
PE	Phycoerythin
PI	Propidiumiodid
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 *Chronisch entzündliche Darmerkrankungen*

In Nordamerika und Europa leiden ca. 3,6 Millionen Menschen an Colitis ulcerosa (CU) oder Morbus Crohn (MC) [1]. Zusammen mit der Pouchitis, einer Erkrankung, die Patienten mit Ileoanalem Pouch betrifft, bilden sie die Gruppe der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED). Nachdem die Inzidenz der CED in Nordeuropa und Nordamerika in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen ist, beginnt sie jetzt zu stagnieren. Dagegen steigt die Inzidenz (besonders die der CU) in Populationen mit traditionell geringeren Neuerkrankungsraten wie z.B. Asien, Afrika und Südamerika [1] weiter an.

### 1.1.1 Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen

#### 1.1.1.1 Genetik

Zwillingsstudien zeigten eine ca. 50%ige Konkordanz zwischen eineiigen Zwillingen bei der Manifestation von Morbus Crohn [2] und eine positive Familienanamnese ist der wichtigste Risikofaktor für CED [3]. Darum gilt eine genetische Komponente für die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen schon lange als wahrscheinlich. Es bestehen Assoziationen zu Allelen des HLA-Klasse I und II Systems [3], wobei sich für MC und CU differente Befunde ergaben. Mehrere für CED prädisponierende Genmutationen sind gefunden worden, die die unterschiedlichen Manifestationen und Verlaufsformen der Erkrankten eingeschränkt erklären können [4].

#### 1.1.1.2 Umweltfaktoren

Der rasche Anstieg der Inzidenz von CED in westlichen Populationen in den letzten Jahrzehnten und die inkomplette Konkordanz bei eineiigen Zwillingen können durch eine rein genetisch bedingte Pathogenese der CED nicht erklärt werden, weshalb eine Beteiligung von Umweltfaktoren als sicher gilt. Nikotingenuss, Hygienestandard, Ernährung und Appendektomie werden neben anderen als Einflussfaktoren diskutiert [3].



### 1.1.1.3 Intestinale Mikroflora

Während die Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen weiterhin nicht geklärt ist, wird die Rolle der intestinalen Mikroflora bei der Initiierung und Perpetuierung des entzündlichen Geschehens allgemein akzeptiert. Für diese Hypothese gibt es vielfältige Indizien:

- Die häufigsten Entzündungen finden statt an den Orten mit den höchsten Bakterienkonzentrationen oder verlängertem Kontakt mit dem Fäkalstrom [5].
- Behandlung mit Antibiotika oder eine Unterbrechung des Stuhlstromes durch ein Ileostoma verbessert den klinischen, histologischen und endoskopischen Befund bei Morbus Crohn. Nachdem die Darmkontinuität wiederhergestellt wird, folgt ein Rückfall. Im Gegensatz dazu spielt bei Colitis ulcerosa ein ausschließliches Ileostoma therapeutisch keine Rolle [5].
- Die experimentelle Kolitis in IL-10 defizienten Mäusen tritt unter keimfreien Bedingungen nicht auf und ist auf die vorherige Etablierung einer intestinalen Mikroflora angewiesen [5].
- Verschiedene Studien zeigten ein vermehrtes Vorliegen von intramural oder in mesenterialen Lymphknoten lokalisierten Bakterien [6].
- Erhöhte Serumantikörpertiter gegen Bakterien der physiologischen Darmflora sind bei CED bekannt [7].
- Besonders *E. coli* scheint in der Pathogenese der CED involviert zu sein [8]. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass von Patienten mit MC isolierte, enteroadhäsive *E. coli*-Stämme fähig sind, intrazellulär zu überleben und sich zu replizieren ohne einen Zelltod zu induzieren [9].

Es existieren also vielfältige Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen CED und der intestinalen Mikroflora, dagegen ist die Suche nach einem spezifischen Keim, der für die Genese verantwortlich gemacht werden könnte, bis heute erfolglos geblieben [10]. Nach dem gegenwärtigen Stand der Forschung liegt den CED eine pathologisch gesteigerte Immunreaktion gegen Bakterien der physiologischen Darmflora bei einem genetisch prädisponierten Wirt zu Grunde.

### **1.1.2 Stellenwert von Probiotika in der Therapie von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen**

Die Ätiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist bis heute nicht geklärt, weshalb keine kausale Therapie zur Verfügung steht. Die Behandlung beruht meist auf einer unspezifischen Hemmung der Entzündungsreaktion in der intestinalen Mukosa. 5-Aminosalizylate (5-ASA), Kortikosteroide und Azathioprin bilden daher die Basis der konservativen Therapie von CED. Ergänzend kommen je nach Verlauf und Komplikationen spezifischere Medikamente wie Cyclosporin und der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab zum Einsatz.

Bei der Therapie von CED unterscheidet man die Remissionsinduktion von der Remissionserhaltung[11]. Die Remissionsinduktion eines akuten Schubes des Morbus Crohn erfolgt je nach Stärke und Lokalisation mit oralen, topischen oder systemischen Steroiden, da sich 5-ASA als wenig effektiv erwiesen haben [12]. Bei Patienten mit häufigen Rezidiven sowie steroidabhängigem oder steroidrefraktärem Verlauf wird bevorzugt Azathioprin oder 6-Mercaptopurin zur Remissionserhaltung eingesetzt. Wegen der im Verhältnis zum Nutzen hohen Risiken und Kosten wird aber keine grundsätzliche Remissionserhaltungstherapie des Morbus Crohn empfohlen [12, 13].

Dagegen sind 5-ASA-Präparate das Basistherapeutikum in der Remissionsinduktion und -erhaltung der Colitis ulcerosa [11, 14]. Im akuten Schub werden 5-ASA topisch und oral eingesetzt. Bei schweren, ausgedehnten und therapierefraktären Schüben kommen zusätzlich topische und systemische Steroide zur Anwendung; als Reservetherapeutikum im fulminanten Schub der Colitis ulcerosa ist Cyclosporin A indiziert.

Im Gegeansatz zum Morbus Crohn sollte bei gesicherter Diagnose einer Colitis ulcerosa nach Remissionsinduktion grundsätzlich eine remissionserhaltende Therapie erfolgen, wobei orale oder rektale 5-ASA-Präparate Mittel der ersten Wahl sind [14]. 5-Aminosalizylate gelten als sicher in der Anwendung und ihr positiver Effekt ist durch eine große Zahl klinischer Studien gesichert. Problematisch sind bei der Verwendung von 5-Aminosalizylaten ein (wenn auch kleiner) Anteil von nichtansprechenden Patienten, sowie unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie eine interstitielle Nephritis (ca. 10,4 Fälle pro 10<sup>6</sup> behandelte Patienten), Pankreatitis (7,5 /

10<sup>6</sup>), Knochenmarkssuppression (10,8-27,6 / 10<sup>6</sup>), Hepatitis oder Hautsymptome [15, 16].

Die besonderen Befunde hinsichtlich der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora bei CED machen deren Modifikation mit Hilfe von Probiotika therapeutisch interessant. Während die Anwendung von probiotischen Bakterienstämmen in vielen Indikationen noch nicht mit randomisierten Studien belegt wurde, ist die remissionserhaltende Therapie der Colitis ulcerosa mit E. coli Nissle 1917 (EcN) mit einem Evidenzgrad Ib wissenschaftlich anerkannt [17].

In drei klinischen, doppelblinden und randomisierten Studien konnte gezeigt werden, dass EcN in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa dem 5-ASA-Präparat Mesalazin gleichwertig ist [18, 19, 20]. Dabei waren in der größten Studie über 320 Patienten eingeschlossen und das Follow up betrug ein Jahr.

Zur Behandlung des Morbus Crohn [21] und der Pouchitits [22] mit EcN existiert zur Zeit allerdings nur geringe Evidenz in Form von Einzelfallberichten oder Studien mit kleinen Populationen.

Eine andere probiotische Präparation (VSL #3), die eine Mischung aus verschiedenen Lactobazillen-, Bifidobakterien- und Streptokokkenstämmen enthält, ist ebenfalls in der Therapie von CED erfolgreich. So konnte die Wirksamkeit von VSL #3 sowohl in der Prophylaxe als auch in der Remissionserhaltung der chronischen Pouchitis gezeigt werden [23, 24]. Die selbe Präparation ist auch erfolgreich in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa bei Patienten mit einer Unverträglichkeit für Salizylate eingesetzt worden [25].

Auch für Helminthen gibt es Hinweise auf eine Anwendungsmöglichkeit als Therapeutikum: In einer kürzlich veröffentlichten Pilotstudie sprachen Patienten mit therapierefraktärem Morbus Crohn auf die orale Gabe von Eiern des Wurmes Trichuris Suis an [26].

## **1.2 Probiotika**

### **1.2.1 Definition**

Probiotika wurden ursprünglich definiert als lebende mikrobielle Nahrungszusätze, die nach oraler Gabe den Wirt günstig beeinflussen, indem sie eine Balance der intestinalen Mikroflora (wieder-) herstellen [27]. Diese Definition musste jedoch

erweitert werden, da erkannt wurde, dass Probiotika eine über die reine Beeinflussung der Mikroflora hinausgehende, z.B. immunmodulatorische Wirkung haben können [28], so dass man sie gegenwärtig allgemeiner als "lebensfähige Mikroorganismen, welche in ausreichenden Mengen konsumiert, einen gesundheitsfördernden Effekt haben" auffasst [29].

Von den Probiotika abzugrenzen sind die so genannten Präbiotika: hierbei handelt es sich um Präparationen, die das Milieu für die Darmflora günstig vorbereiten sollen, sowie Synbiotika (Kombinationen aus beidem).

### **1.2.2 Als Probiotika verwendete Species**

Verschiedene Bakterienspezies und -stämme sind als Probiotika in unterschiedlichen Indikationen in Gebrauch:

- *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus plantarum*,
- *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium infantis*,
- *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*
- Der Hefepilz *Saccharomyces boulardii*
- *E. coli* Nissle 1917

Weiterhin existiert unter dem Namen VSL#3 ein Mischpräparat aus vier Lactobazillen- und drei Bifidobakterienstämmen sowie *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus*.

Probiotika werden als Nahrungsbestandteile (z.B. fermentierte Milchprodukte) in den verschiedensten Kulturkreisen seit vielen Jahren eingesetzt, und können auch als Nahrungsergänzungen oder in Form von Medikamenten dargereicht werden.

### **1.2.3 Indikationen**

Neben der Behandlung von CED haben Probiotika in der Medizin ein breites Feld von möglichen Anwendungen bei infektiösen, allergischen, inflammatorischen bis hin zu neoplastischen Erkrankungen [30]:

Dank mehrerer randomisierter doppelblinder Studien kann eine Wirksamkeit bestimmter Bakterienstämme bei der Behandlung der akuten rotavirusassoziierten

Diarrhoe als gesichert angesehen werden (Übersicht in [31]). In der Prävention der antibiotikaassoziierten Diarrhoe ist durch Metaanalysen ein günstiger Effekt ebenfalls evident [32, 33]. Einzelne randomisierte, doppelblinde Studien zeigten darüber hinaus therapeutische Wirksamkeit bei chronischer Verstopfung [34] und der Prävention des atopischen Ekzems [35].

Weniger gut gesichert ist die Behandlung der Divertikulitis mit EcN [36], der kollagenen Kolitis [37], sowie der Leberzirrhose [38] und anderer Lebererkrankungen [39]. Die prophylaktische orale Administration probiotischer Bakterien konnte außerdem bei frühgeborenen Kindern die nosokomiale Infektionsrate und die Mortalität senken [40].

Lediglich Einzelfallberichte existieren für die Therapie der pseudomembranösen Colitis [41] sowie der Halitosis [42] jeweils mit E. coli Nissle 1917. Erste Hinweise auf mögliche Indikationen probiotischer Präparate gibt es außerdem für bestimmte Patientengruppen mit Reizdarmsyndrom [31], die Rheumatoide Arthritis [43], die bakterielle Vaginose [44] sowie eine Beeinflussung des Darmkrebs- [31] und Atheroskleroserisikos [45].

Abweichend vom üblichen Verständnis probiotischer Therapie steht für die Zukunft die Erforschung von gentechnisch modifizierten Bakterien als Vektoren für Pharmaka im Blickfeld der Forschung. Steidler *et al.* haben den „*proof of principle*“ erbracht, dass es möglich ist, Lactobazillen so zu modifizieren, dass diese IL-10 sezernieren und haben damit in einem murinen Kolitismodell eine histologische Besserung der mukosalen Entzündung erreicht [46]. Vorteilhaft in einem derartigen System sind die hohen lokal erreichbaren Wirkspiegel, ohne dass man systemische Toxizität befürchten muss.

#### **1.2.4 Wirkprinzipien**

Die Wirksamkeit von Probiotika bei unterschiedlichen Erkrankungen wird durch eine Beeinflussung des luminalen Milieus, bestimmte Stoffwechselaktivitäten oder eine Modulation des Immunstatus des Wirtes erklärt.

So führen kurzkettige Fettsäuren zu gesteigerter intestinaler Durchblutung, einer Massezunahme des Stuhls, sowie einer verstärkten Peristaltik und schnellerer Stuhlpassage [34]. Für die Immunmodulation werden unter Anderem bakterielle, formylierte Peptide, Peptidoglykane der Zellwand und Nukleotide verantwortlich

gemacht [30], die möglicherweise zu einer Konditionierung des Immunsystems führen. Die Produktion antimikrobieller Substanzen durch Probiotika könnte eine Rolle (nicht nur) bei infektiösen Darmerkrankungen spielen. Bekannt ist außerdem eine Verbesserung der intestinalen Mukosabarriere [47] sowie der Darmzellregeneration [48] durch probiotische Bakterienstämme.

Im Einzelfall sind allerdings die Prinzipien, über die Probiotika einen therapeutischen Effekt ausüben, oft nicht bekannt; sie sind Objekt gegenwärtiger Forschungsarbeiten.

### **1.2.5 Risiken und Probleme probiotischer Therapie**

Probiotika werden schon sehr lange angewendet und ihre Sicherheit wird allgemein als hoch eingeschätzt. Als lebende Organismen können Probiotika jedoch theoretisch vier Arten von Nebenwirkungen auslösen:

- schädliche Stoffwechselaktivitäten,
- Überstimulation des Immunsystems,
- Infektionen und
- Transfer von schädlichen Genen auf andere Spezies [30].

#### **1.2.5.1 Stoffwechselprodukte und Entgiftung**

Als schädliche Stoffwechselwirkungen sind die Produktion von Ammonium, Phenol, Indol, Aminen und potentiell karzinogenen sekundären Gallensäuren in der Diskussion [49]. Viele dieser Produkte sind bis heute allerdings nur für Lactobazillen als am häufigsten verwendete probiotische Spezies ausreichend erforscht [50].

Problematisch sind mögliche Wechselwirkungen von Probiotika mit der begleitenden medikamentösen Therapie: Luminale Bakterien hydrolysieren oder dehydroxylieren Medikamente und wirken so bei ihrer Entgiftung mit. Die verschiedenen Spezies der Darmflora unterscheiden sich in der Expression und der Aktivität der hierbei beteiligten Enzyme. Bemerkenswert ist dies besonders für Stoffe mit enterohepatischem Kreislauf wie zum Beispiel Acetyldigoxin oder Östrogenpräparate, deren Ausscheidung oder Reabsorption (und damit ihr Serumwirkspiegel) bei einer Veränderung der Zusammensetzung der intestinalen Mikroflora beträchtlich schwanken können [51]. Dies eröffnet die Möglichkeit vielfältigster Medikamentenwechselwirkungen unter probiotischer Therapie.

#### 1.2.5.2 Wechselwirkungen mit dem Immunsystem

Die immunstimulatorische Wirkung von Bakterienwandbestandteilen könnte besonders im Zusammenhang mit bestehenden Autoimmunerkrankungen unerwünscht sein. Bis auf einen Patienten, dessen Autoimmunhepatitis möglicherweise durch den Konsum von Joghurt aktiviert wurde [52], sind jedoch keine derartigen Fälle bekannt. Im Tierversuch wurde aber gezeigt, dass bestimmte bakterielle Zellwandbestandteile, Lipopolysaccharide, bei einer vorliegenden Verletzung der Darmwand durchaus in die Blutbahn gelangen können. Lipopolysaccharide sind potente Immunstimulatoren und werden für die Aktivierung der Kupfer-Zellen und den Leberschaden bei alkoholtoxischer Leberzirrhose verantwortlich gemacht [53].

#### 1.2.5.3 Infektionen

Die Fähigkeit von probiotischen Bakterienstämmen, gastrointestinalen Lebensbedingungen lange stand zu halten, birgt als prinzipielles Risiko der Behandlung mit Probiotika die Gefahr einer Infektion und Sepsis [28], obwohl die fehlende Pathogenität und Infektiösität Bestandteil der Definition von Probiotika sind [49]. Von den als Probiotikum genutzten Spezies sind am häufigsten Enterokokken an klinischen Infektionen beteiligt. Zusätzlich scheinen diese für Vancomycinresistenz empfänglich zu sein, so dass ihre sichere Anwendung zur Diskussion steht (abgesehen davon haben manche ihrer angeblichen Wirkungen genaueren Studien nicht standgehalten) [54].

Es sind 180 Fälle von Bakteriämie und 69 Fälle von Endokarditis durch Lactobazillen in den letzten 30 Jahren in der Literatur beschrieben [55], wobei die Infektionsquelle meistens die wirtseigene Mikroflora war. In einzelnen Fällen war jedoch der isolierte Keim nicht von einem vorher applizierten Probiotikum zu differenzieren [56, 57]. In anderen Fällen war der gefundene Keim letztlich mit verhältnismäßig aufwändigen Methoden von als Probiotikum verwendeten Stämmen zu unterscheiden [58, 59, 60], was die Wichtigkeit der Existenz eines genauen Stammpasses sowie sicherer Nachweismethoden für die Beurteilung der Sicherheit unterstreicht.

Fälle von ernsten klinischen Zwischenfällen bis hin zur Sepsis nach Anwendung von Probiotika sind für die Hefe *Saccharomyces boulardii* beschrieben. Dabei handelte es sich um eine Fungämie bei Intensivpatienten, die Breitspektrumantibiose erhielten

und zur Prophylaxe der antibiotikaassoziierten Diarrhoe mit *Saccaromyces boulardii* behandelt wurden. In fast allen Fällen lag eine Infektion eines Gefäßkatheters vor und die Infektion schien über die kontaminierten Hände des Pflegepersonals stattgefunden zu haben [61, 62].

#### 1.2.5.4 Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von Probiotika folgt komplizierten Gesetzmäßigkeiten und ist mit herkömmlichen Methoden kaum zu messen. Die tatsächlich wirksamen Bakterienprodukte sind in den seltensten Fällen bekannt, weshalb man sich in der Vergangenheit meistens auf die Erforschung des Überlebens der Bakterien im Gastrointestinaltrakt beschränkt hat. Die Menge an Bakterien, die notwendig ist, um eine Wirkung zu erzielen, ist jedoch nicht bekannt und mehr oder weniger willkürlich auf zwischen  $10^6$  und  $10^8$  koloniebildende Einheiten festgelegt worden [30]. Dosis-Wirkungsstudien sind nur in wenigen Fällen durchgeführt worden. Das Überleben und die fäkale Elimination von Probiotika sind darüber hinaus von so variablen Faktoren wie der Darmmotilität, der Wirtsflora, verschiedenen Verdauungssekreten, dem intestinalen Immunsystem, diätischen Faktoren und der Darreichungsform abhängig [30].

Aus der Tatsache, dass die Wirkmechanismen vieler Probiotika wenig erschlossen sind, ergeben sich weitere Probleme. So ist häufig nicht bekannt, welche Patienten von welchem Stamm profitieren und ob und wann eine Therapie mit einem Mischpräparat sinnvoll erscheint. Klare Dosis-Wirkungsbeziehungen sind schon theoretisch nicht zu erwarten und in Studien bis jetzt nicht untersucht worden. Die Therapieentscheidung muss deshalb in der Praxis klinisch orientiert erfolgen, was vom wissenschaftlichen Standpunkt und für die breite Anwendung von Probiotika unbefriedigend ist [29].

#### 1.2.6 Anforderungen an Probiotika

Allgemein gilt es daher strenge Sicherheitsanforderungen an die Präparationen zu stellen:

Vorliegen von

- Erkennungsmarkern ("Stammpass"), damit eine Unterscheidung von anderen Mitgliedern der Flora möglich ist und die Stabilität kontrolliert werden kann.



- Magensäure- und Galleresistenz, Fähigkeit, den Darm zumindest vorübergehend zu kolonisieren.

Fehlen von

- Antibiotikaresistenz (oder zumindest das Fehlen von mehr Resistenzen als für den gegebenen Einsatzzweck nötig sind).
- Toxinbildung, Hämolsinbildung
- Enteroinvasivität
- Serumresistenz
- Transferablen Plasmiden, die als Übermittler von Resistenz- oder Pathogenitätsfaktoren wirken können.
- Pathogenen Adhäsionsmolekülen (P-, M-, S-Fimbrien, CFA I/II-Fimbrien), Typ-III-Sekretionssystem

(nach: [63] und [49])

### **1.3 *Escherichia coli* Stamm Nissle 1917**

*Escherichia coli* ist ein gramnegatives fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium, das der physiologischen Flora im Dickdarm des Menschen und warmblütiger Tiere angehört. Mit durchschnittlich  $10^8$  Keimen pro Gramm Fäces ist es eine der häufigsten gramnegativen Species im Dickdarm [64]. Neben den apathogenen Stämmen existieren fakultativ oder obligat pathogene Keime, die sich von ersteren durch Vorhandensein von bestimmten Pathogenitätsfaktoren unterscheiden. Diese können sowohl auf dem Bakterienchromosom als auch auf Plasmiden lokalisiert sein. Es handelt sich dabei um P- oder S-Fimbrien, die als Adhäsine wirken, eine Polysaccharidkapsel als Phagozytoseresistenzfaktor, Hämolsine (Porenbildner, Zytokine) oder Eisenaufnahmesysteme (Häminverwertung) [65].

Es ist bekannt, dass *E. coli* eine besondere Rolle in der Pathogenese von CED spielt [8], und es gibt Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von ilealen Läsionen und bestimmten *E. coli*-Genotypen [66].

#### **1.3.1 Geschichte**

Der *E. coli* Stamm Nissle 1917 (EcN) wurde durch Prof. Dr. med. Alfred Nissle (1874-1965) aus dem Darm eines Pionierunteroffiziers im Balkankrieg isoliert, nachdem

ihm aufgefallen war, dass dieser im Gegensatz zu seinen Kameraden von einer Darmkrankheit verschont geblieben war [67]. Schon zuvor hatte Nissle die Rolle der physiologischen Darmflora für die Pathogenese von infektiösen Darmerkrankungen erkannt und den Antagonismus von Kolibakterien gegen pathogene Darmkeime untersucht. In diesem Zusammenhang prägte Nissle den (umstrittenen) Begriff der Dysbakterie (als Abweichen der physiologischen Darmflora von der Norm), den er später auf nichtinfektiöse Darmerkrankungen (wie Colitis ulcerosa) und sogar maligne Erkrankungen ausdehnte.

Nachdem Nissle das aus dem Bakterienstamm hergestellte Präparat im Jahr 1917 zum Patent angemeldet hatte, vertrieb er es unter dem Namen Mutaflor®. Seitdem wurde EcN in vielfältigen Indikationen angewendet.

### **1.3.2 Stammcharakteristik und Eigenschaften**

E. coli Nissle 1917 (synonym E. coli DSM 6601) ist typisiert als Serovar O6:K5:H1. Die Lipopolysaccharidstruktur der Zellwand von EcN ist vollständig bestimmt worden und zeigt ein molekulares Muster, das unter E. coli-Stämmen einmalig ist. Diese besondere Oberflächenstruktur ist für die Serumsensibilität des Keimes verantwortlich [68].

EcN bildet weder hitzelabile noch hitzestabile Enterotoxine, Zytotoxine oder *Shiga-like* Toxine, ist nicht invasiv, ist serum- und antibiotikasensibel und ein schlechter Rezipient von Fremd-DNA (z.B. Resistenzplasmide). Weiterhin nimmt er keine durch Bakteriophagen kodierte genetische Information auf. EcN kann zeitsparend und sensitiv mittels PCR unabhängig vom Vorhandensein anderer E. coli Stämme im Stuhl von Patienten nachgewiesen werden [69] und ist biochemisch, mikrobiologisch und serologisch vollständig charakterisiert. Die Genomstruktur von EcN ist vollständig aufgeklärt [70].

EcN besitzt aufgrund besonderer Stoffwechseleigenschaften viele Selektionsvorteile im Ökosystem des Dickdarmes und ist ein guter Kolonisierer [71, 72].

Für E. coli Nissle 1917 liegen trotz der langen Anwendungsgeschichte bisher keine Berichte von ernsten Zwischenfällen vor [73]. Obwohl EcN schon seit über 85 Jahren in der Medizin eingesetzt wird und klinische Studien eine Indikation in der Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa gesichert haben, ist der Mechanismus, über den EcN seine günstigen Effekte ausübt bis heute nicht bekannt.

## **1.4 Das mukosale Immunsystem und Lamina propria T-Zellen**

### **1.4.1 Zusammensetzung und Interaktionen**

Die intestinale Mukosa ist mit  $200-400\text{m}^2$  die größte Grenzfläche des Organismus zu seiner Umwelt [74]. Diese Grenze wird gebildet durch ein komplex reguliertes Netzwerk aus Zellen verschiedener Abstammung und Zytokinen. Dabei übernehmen Epithelzellen nicht nur die Bildung einer anatomischen Barriere, sondern sind auch an der Immunabwehr aktiv beteiligt [75].

An der immunologischen Barriere sind unspezifische Mechanismen wie pH-Wert, Mucusproduktion, Peristaltik, chemische Faktoren (Lysozym, Defensine) und Phagozytose beteiligt. Das spezifische Immunsystem betreffend ist die Darmmukosa die größte Ansammlung lymphatischen Gewebes im menschlichen Körper und der größte Produzent von Immunglobulinen [64]. Die zellulären Bestandteile dieses antigen-spezifischen Teils des intestinalen Immunsystems sind Granulozyten, dendritische Zellen, Lymphozyten, Makrophagen und M-Zellen.

Das darmassoziierte Immunsystem (*gut associated lymphoid tissue*, GALT) ist in den Peyer'schen Plaques organisiert; darüber hinaus befinden sich intraepitheliale und mukosale Lymphozyten mit besonderen funktionellen Eigenschaften frei in den entsprechenden Gewebsschichten. Dabei kommt den Lamina propria Lymphozyten die herausragende Rolle zu, bei der es sich um eine Population von gereiften, immunkompetenten T- und B-Zellen handelt, welche nach ihrer Aktivierung in den Peyer'schen Plaques in die Mukosa auswandern [76].

### **1.4.2 Die bakterielle Mikroflora**

#### **1.4.2.1 Größe und Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora**

Die menschliche Mikroflora umfasst 400-500 verschiedene Spezies und mit  $10^{14}$  Bakterien ca. 10 mal mehr Zellen als der menschliche Körper [31]. Diese Organismen befinden sich auf der Haut, im Mund, im Magen-Darm-Trakt, in den oberen Luftwegen sowie im Urogenitaltrakt. Die Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora etabliert sich im frühen Kindesalter und bleibt im Erwachsenenalter konstant; sie ändert sich aber im Verlauf des Magen-Darm-Kanals [8]. Dabei stellt der Dickdarm mit ca.  $10^{12}$  koloniebildenden Einheiten pro Milliliter Inhalt den mit Abstand größten Anteil. Hier überwiegen die obligat anaeroben Bakterien:

Bacterioides, Bifidobakterien, Eubakterien, grampositive Kokken. Die aeroben Spezies sind meist Enterokokken, Streptokokken, Staphylokokken und der Pilz Candida [31, 51].

#### 1.4.2.2 Funktion und Aufgaben

Die Darmflora hat ein Gesamtgewicht von ca. 1-2 kg und ihre Stoffwechselleistung entspricht der der Leber, so dass sie als eigenständiges funktionelles Organ angesehen werden kann [17]. Die Aufgaben der bakteriellen Mikroflora umfassen die Verstoffwechselung von Mukosazellen und Sekretionsprodukten sowie Kohlenhydraten aus der Nahrung, die im oberen Darmtrakt noch nicht verdaut wurden [64] und die Produktion von Substanzen wie z.B. Vitamin K und B [31]. Die enterische Bakterienflora ist der wesentliche Stimulus für die Entwicklung des intestinalen Immunsystems [77]. Sie ist außerdem selbst ein Teil der Abwehrmechanismen, die der menschliche Körper enterischen Pathogenen entgegensetzt, da eine intakte intestinale Bakterienflora das Wachstum und die Adhäsion von pathogenen Keimen verhindert. Dabei kann sie durch Konkurrenz um essenzielle Nahrungsstoffe oder Bindungsstellen oder durch Produktion inhibitorischer Substanzen Keime verdrängen oder schädliche Stoffwechselprodukte metabolisieren [51].

Über die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hinausgehend gibt es zunehmende Anzeichen, dass die bakterielle Mikroflora einen Anteil an der Genese von autoimmunen, multifaktoriellen und chronisch entzündlichen Erkrankungen hat [8, 78].

#### 1.4.3 Orale Toleranz

Die intestinale Mikroflora stellt das mukosale Immunsystem vor eine schwierige Aufgabe: Einerseits hat das Immunsystem die bakterielle Translokation aus dem Lumen zu verhindern und muss auf pathogene Bakterien durch zügige Proliferation und Expansion spezifischer Zellklone reagieren. Auf der anderen Seite darf das Immunsystem nicht unkontrolliert gegen den antigenen Reiz reagieren, da sonst nützliche Bakterien eliminiert würden und es unweigerlich zu einer chronischen Entzündung käme [8]. Die Zellen des Abwehrsystems müssen also eine Toleranz gegenüber oral aufgenommenen Antigenen und kommensalen Bakterien aufweisen;

das Immunsystem des Darmes gesunder Menschen befindet sich in einem Zustand "physiologischer Entzündung" [77]

#### 1.4.3.1 Regulation der Effektorzellproliferation

Wie das Immunsystem die andauernde Immunstimulation durch die Bakterienflora in geregelten Grenzen hält ist bis heute unklar. Sicher ist, dass die luminale Bakterienflora und das Immunsystem des Wirtes in einer ständigen Interaktion stehen. Studien zur Charakterisierung der Eigenschaften von T-Zellen aus der Lamina propria des Darmes haben gezeigt, dass diese Zellen sich in einem dauerhaft aktivierten Zustand befinden, aber nach einer Stimulation des T-Zell Rezeptors nur langsam proliferieren. Als Ursache dieser Anergie werden regulatorische  $T_{R1}$ -und  $T_{H3}$ -Zellpopulationen vermutet, welche die antigeninduzierte Aktivierung von T-Zellen durch Sekretion bestimmter Zytokine antagonisieren [77].  $T_{R1}$ -Zellen sollen durch die Antigene der enterischen Mikroflora induzierbar sein und spezifisch die reagierenden Effektor T-Zellen supprimieren können [79]. Andere Zellen, die nicht notwendiger Weise zu den klassischen immunkompetenten Zellpopulationen gehören müssen, kommen für diese regulatorische Funktion ebenfalls in Betracht: Die aktive Rolle der mukosalen Epithelzellen wird gerade erst erkannt [80].

#### 1.4.3.2 Regulation des Effektorzelltodes

Auch der Untergang von Effektorzellen des Immunsystems wirkt einer unphysiologischen Entzündungsreaktion gegen die enterale Mikroflora entgegen. Der programmierte Zelltod (Apoptose) von T-Zellen ist ein Prozess, der die Vielfältigkeit, Spezifität sowie die Gedächtnisfunktion des adaptiven Immunsystems aufrecht erhält [81]. Nachdem eine effektive Immunantwort auf ein Antigen durch Expansion spezifischer T-Zellklone gegeben wurde, muss der Zellpool durch Apoptose reduziert werden da sonst die Wahrscheinlichkeit autoreaktiver T-Zellklone steigen würde [82]. In Lamina propria T-Zellen des Darmes ist die Apoptose der Schlüssel zur Wahrung der oralen Toleranz [81], indem sie der antigeninduzierten Expansion aktivierter Zellen entgegenwirkt.

Dieser für den Wirt entscheidenden Aufgabe entsprechend haben T-Zellen aus der Lamina propria von gesunden Probanden gegenüber peripheren T-Zellen eine erhöhte Bereitschaft zur Apoptose, welche die Expansion des Zellpools begrenzt.

Es konnte aber gezeigt werden, dass bei Patienten mit CED verschiedene molekulare Mechanismen, die zur Apoptose der Zellen beitragen, gestört sind. Durch das verlängerte Überleben dieser Zellen besteht eine größere Effektorzellpopulation, werden mehr proinflammatorische Zytokine produziert und die chronische Entzündung aufrechterhalten [83].

Diese Befunde haben dazu geführt, eine Hyperreaktivität des Immunsystems gegen ubiquitäre Antigene der eigenen Mikroflora in der Initiierung oder Perpetuierung der CED als ursächlich anzunehmen [84], ohne dass bekannt wäre, worauf diese beruht. Insbesondere der Zusammenhang der Genprodukte von CED-Kandidatengenomen mit der gestörten Regulation des Immunsystems ist erst im Ansatz aufgeklärt [4].

## **1.5 Aufgabenstellung**

In westlichen Kulturkreisen leidet eine große Patientenpopulation unter chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Neben der klassischen Therapie mit 5-Aminosalizylaten zur Remissionserhaltung der Colitis ulcerosa konnte in randomisiert-doppelblinden Studien auch durch orale Gabe des probiotischen *E. coli* Stammes Nissle 1917 (EcN) eine erfolgreiche Remissionserhaltung durchgeführt werden. EcN ist sicher in der Anwendung, gut charakterisiert und besitzt Fitnessfaktoren, die ihn zu einem guten Kolonisierer des intestinalen Milieus machen. Obwohl verschiedene immunmodulatorische Effekte von EcN nachgewiesen wurden, ist der definitive Wirkmechanismus bei CED bis heute jedoch nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Promotionsarbeit war es, die immunmodulatorischen Effekte von EcN auf periphere und mukosaständige Immunzellen weitgehend zu charakterisieren, um einen Erklärungsansatz für die klinische Wirksamkeit liefern zu können. Dafür wurden die Apoptose, Zellzyklusprogression, Expansion und Zytokinsekretion von peripheren- und Lamina propria T-Zellen in Gegenwart von EcN-Kulturüberständen oder aber hitzeinaktivierten EcN gemessen und die Expression entsprechender Regulationsproteine bestimmt. Als Hypothese wurde angenommen, dass EcN die Zellzyklusprogression und Expansion von humanen T-Zellen hemmt und bzw. oder die Apoptoserate in dieser Zellpopulation erhöht.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Antikörper und Reagenzien

Nicht erwähnte Materialien, Reagenzien und Geräte entsprechen denjenigen, die in der Laborroutine in einem medizinisch-naturwissenschaftlich arbeitenden Labor verwendet werden und bei entsprechenden Firmen zu beziehen sind. Das gleiche gilt für Lösungen und Reagenzien, deren Zusammensetzung nicht näher erläutert wird. Alle Reagenzien wurden wie vom Hersteller empfohlen gelagert und gelöst oder verdünnt.

#### 2.1.1 Medien und Puffer

Complete Medium ohne Penicillin/Streptomycin (P/S)	10% fetales Kälberserum (FCS), 1,5% HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonsäure; Merck, Darmstadt) in RPMI 1640
PBS/BSA	20mg/ml bovines Serumalbumin (BSA, Sigma Aldrich, Taufkirchen), in PBS, pH 7,4
Borat Puffer	0,1M Borsäure, Natriumborat, 0,15M NaCl in ddH <sub>2</sub> O, pH 8,5
MACS-Puffer	0,5% BSA, 2mM EDTA in Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS), pH 7,2
Enzymatische Lösung	0,01% Kollagenase Typ III, (Worthington Biochemical, Lakewood, NJ, USA); 0,01% DNase Typ I, (Roche Diagnostics, Mannheim); 2,5% Penicillin-Streptomycin (Biochrom AG, Berlin); 1% Gentamicin (GibcoGBL, Paisley, Scotland); 2,5% 1M HEPES (Merck, Darmstadt); in HBSS ohne Ca/Mg
PBS-BT	PBS/BSA mit 0,5% Triton X-100 (Sigma Aldrich, Taufkirchen)

### (Fortsetzung Medien und Puffer)

Lyse-Puffer	0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS, 1% Triton-X100, 0,5% NP-40, 5mM EDTA (alle Sigma Aldrich, Taufkirchen) in PBS
Western Blot Probenpuffer	NuPAGE LDS Sample Buffer (Invitrogen Corp., Karlsruhe)
Western Blot Laufpuffer	NuPAGE SDS MOPS Running Buffer (Invitrogen Corp., Karlsruhe)
Western Blot Transferpuffer	NuPage Transfer Buffer (Invitrogen Corp., Karlsruhe)
Western-Blot Blocking Puffer	5% Non Fat Dry Milk, Bio-Rad, München; 0,1% Tween-20, Merck-Schuchardt, Hohenbrunn; in 1xPBS
Western-Blot Waschpuffer	0,1% Tween-20 in 1xPBS

## 2.1.2 Reagenzien für Western Blots

### 2.1.2.1 Primärantikörper

Spezifität	Klon	Hersteller
Anti-Bax	B-9	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-Bcl-2	C-2	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Anti-CD95	13	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Rb	G3-245	BD Pharmingen, Heidelberg



### (Fortsetzung Primärantikörper)

Anti-active-Caspase 3	5F6.H7	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-Cytochrom c	7H8.2C12	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-p21	SXM30	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-p53	DO-7	BD Pharmingen, Heidelberg

#### 2.1.2.2 Sekundärantikörper und weitere Reagenzien

Substanz	Hersteller
Goat-anti-Mouse-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg
Jurkat-Cell-Extract (Positivkontrolle)	Biomol Research Labs, Plymouth Meeting, PA, USA
Multimark Rainbow Marker	Invitrogen Corp., Karlsruhe

#### 2.1.3 Reagenzien für die Durchflusszytometrie

##### 2.1.3.1 Antikörper

Spezifität	Klon	Markierung	Hersteller
Mouse-IgG1, $\kappa$	MOPC-21	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Mouse-IgG	MOPC-21	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-hu-Cyklin A	BF683	-	BD Pharmingen, Heidelberg

**(Fortsetzung Antikörper)**

Anti-hu CD3	UCHT1	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-hu CD45 RA	MEM-56	FITC	Immunotools, Friesoythe
Anti-hu CD45 RO	UCHL1	FITC	Immunotools, Friesoythe
Anti-hu CD69	L78	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-hu Cyklin B1	GNS-1	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-hu Caspase 3	Polyklonal	PE	BD Pharmingen, Heidelberg
Goat-anti-Mouse-Ig	Polyklonal	FITC	Biosource, Solingen
Anti-BrdU	B44	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg

**2.1.3.2 Weitere Reagenzien**

<b>Substanz</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller</b>
Annexin-V	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Propidium Iodid	-	Calbiochem, Darmstadt

## **2.2 Zellpräparation**

### **2.2.1 Zellzählung**

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer nach Färbung der nicht vitalen Zellen mit einer 1:5 verdünnten Trypanblaulösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen).

### **2.2.2 Präparation von peripheren Blut mononukleären Zellen**

Die Präparation von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) erfolgte aus heparinisiertem Vollblut von gesunden freiwilligen Spendern. Ein positives Ethikvotum lag für diese Untersuchungen vor. Die Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Durch Dichtegradientenzentrifugation über einer Ficoll-Lösung (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Upsala, SE) wurde eine Interphase gebildet, in der sich die periphere mononukleäre Zellpopulation befindet. Die Interphase wurde mit einer Pipette abgenommen und zwei mal zentrifugiert (5 Minuten bei 1500/min) und in PBS resuspendiert um Thrombozyten und Zelltrümmer herauszuwaschen.

### **2.2.3 Präparation von LPMC**

Die Präparation von mononukleären Zellen der Lamina propria erfolgte aus Resektionsmaterial von Patienten mit malignen und nichtmalignen Darmerkrankungen. Für die Verarbeitung dieses Materials bestand ebenfalls ein positives Votum der Ethikkommission. Bei maligner Grunderkrankung wurde nur tumorfernes Gewebe weiter verarbeitet. Die Proben wurden unter Wahrung einer kurzen Ischämiezeit auf Eis in 0,9%iger Kochsalzlösung ins Labor transportiert. Dort wurde die Mukosa mehrfach mit Kochsalzlösung gespült und mit Zellstoff abgetupft, um grobe Verunreinigung zu beseitigen. Dann wurden längs zum Organverlauf Mukosastreifen von ca. 1mm Breite exzidiert. Diese wurden 30 Minuten in 50ml HBSS mit 75mg DTT (Sigma Aldrich) auf einem Magnetrührer vorsichtig bei Raumtemperatur gerührt, um die luminale Mucusschicht samt der enthaltenen Bakterienkolonien zu entfernen. Dann wurden die Mukosastreifen drei mal 30 Minuten mit 1mM EDTA (Sigma Aldrich) in HBSS ohne Ca/Mg gerührt, welches die epithelialen Bindungen löste. Dann wurden die Proben zwei mal 30 Minuten in HBSS ohne Ca/Mg gespült, bevor sie über Nacht in HBSS mit 2,5% Penicillin-Streptomycin-Fungizone (Gibco-Invitrogen, Karlsruhe) bei 4°C gerührt wurden. Am nächsten Tag

wurden die Streifen in Stücke von maximal 2mm Länge geschnitten. Diese wurden 5 Stunden bei 37°C in 100ml Enzymatischer Lösung gerührt. Die entstandene Zellsuspension wurde durch ein Sieb abgegossen, zentrifugiert und in HBSS aufgenommen. Durch Dichtegradientenzentrifugation über einer Ficoll-Lösung wurde eine Interphase gewonnen, die zwei mal mit PBS gewaschen wurde. Sie enthielt bei durchflusszytometrischer Messung typischer Weise mehr als 50% CD3-positive Zellen, die Population der Lamina propria T-Zellen (LPT). Die beschriebene Präparation erfolgte modifiziert nach [85].

#### **2.2.4 Magnetische Anreicherung von Zellpopulationen**

Für verschiedene Versuche, die phänotypisch einheitliche Zellpopulationen erforderten, wurden die Zellen aus 2.2.2 mittels magnetischer *Beads* sortiert. Dabei handelt es sich um magnetische Partikel, die mit spezifischen Antikörpern beschichtet sind. Die Zellen, die an den Antikörper gebunden sind, werden durch ein Magnetfeld aussortiert.

Dafür wurden die PBMC einmal in MACS-Puffer gewaschen und dann in 80µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen aufgenommen. Dann erfolgte eine 20 minütige Inkubation mit den entsprechenden Antikörperbeads im Wasserbad bei 4°C.

Um T-Lymphozyten anzureichern wurde eine Positivselektion mit CD3-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal zentrifugiert und dann in 800µl MACS-Puffer aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf eine MACS-Säule appliziert, die zuvor durch Spülen mit MACS-Puffer vorbereitet und in einem MidiMACS-Magneten platziert worden war. Die CD3-negative Zellfraktion, die die Säule passiert, wurde verworfen. Die CD3-positive Zellfraktion, welche die T-Zellen repräsentiert, wurde gesammelt, nachdem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt worden war. Die Reinheit der Zellpräparation wurde routinemäßig durchflusszytometrisch bestimmt und lag im Durchschnitt bei 99,3%.

Zusätzlich wurden CD45RA- und CD45RO-positive T-Zellen durch Negativselektion angereichert. Dafür wurden die PBMC mit anti-CD14-Microbeads (gegen Monozyten, Granulozyten), anti-CD19-Microbeads (gegen B-Lymphozyten), anti-CD16-Microbeads (Granulozyten), und entweder anti-CD45RO (um CD45RA-positive Zellen anzureichern) oder CD45RA-Microbeads (um CD45RO-positive Zellen zu

erhalten), inkubiert (alle Beads wurden von Miltenyi Biotec bezogen). Die Zellsuspension wurde nach der Inkubationszeit einmal gewaschen und dann in 800µl MACS-Puffer aufgenommen, um auf die wie oben vorbereitete Säule gegeben zu werden. In diesem Fall wurde die negative Fraktion gesammelt und die magnetisch markierte Fraktion verworfen.

## **2.3 Präparation von Bakterienkulturen**

Alle Arbeiten erfolgten an einer sterilen Werkbank. Die Präparation der Bakterienkulturen erfolgte in Anlehnung an [86].

### **2.3.1 Primärkultur**

Mit E. coli beschichtete Glasperlen (Ardeypharm, Herdecke) wurden in Kulturflaschen mit 10ml Luria Broth überführt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 16 Stunden inkubiert. Um die Bakteriendichte in der Kultur zu messen wurde die optische Dichte der Kultur bei einer Wellenlänge von 600nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt, die immer bei 0,7 lag.

Aus dieser Primärkultur wurden dann hitzeinaktivierte Bakterien sowie ein konditioniertes Medium hergestellt. Es wurden außerdem zum Vergleich Experimente mit den E. coli Stämmen PZ 830, PZ 831, PZ 840, PZ 970 und DSM 481 durchgeführt (alle Ardeypharm, Herdecke). Diese wurden so behandelt wie der EcN und wurden jeweils so lange inkubiert, bis ihre OD<sub>600</sub> der des als Kontrolle mitgeführten EcN entsprach.

### **2.3.2 E. coli Nissle 1917 konditioniertes Medium**

Um ein konditioniertes Medium aus E. coli Bakterien (EcN-CM) herzustellen wurde Complete Medium ohne Antibiotika oder Antimykotika mit der Primärkultur aus 2.3.1 beimpft und in Kulturflaschen 1,5 Stunden bei 37°C CO<sub>2</sub>-gepuffert inkubiert. Dann wurde die Kultur 15 Minuten bei 1000g zentrifugiert und der Überstand durch einen Filter mit 0,22µm Porengröße sterilfiltriert. Die beschriebene Zubereitung erfolgte in Anlehnung an [86].

### **2.3.3 Hitzeinaktivierte E. coli**

Die Bakterien aus 2.3.1 wurden durch Zentrifugation bei 1000g 15min pelletiert und dann in PBS aufgenommen und 60 Minuten bei 65°C inaktiviert (hi-EcN). Danach wurden die Bakterien 15 Minuten bei 1000g zentrifugiert und die Pellets in Complete

Medium ohne Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die Bakterienkonzentration entsprach der eines entsprechenden konditionierten Mediums vor der Sterilfiltration. Zur Kontrolle der Inaktivierung wurde ein Bakterienmedium mit den hitzeinaktivierten Bakterien beimpft und 24h inkubiert, bevor es mikro- und makroskopisch auf bakterielles Wachstum überprüft wurde.

Hitzeinaktivierte E. coli und E. coli konditioniertes Medium wurden innerhalb von ein bis zwei Stunden weiterverarbeitet und bis dahin auf Eis gelagert.

## **2.4 Zellkultur**

Die Zellkultur erfolgte über einen Zeitraum von 72h in 24 Well Platten mit  $2 \times 10^6$  Zellen in einem Milliliter Medium.

### **2.4.1 Vorbereitung der Zellkulturplatten**

Um die Zellen zu stimulieren wurde ein plattengebundener, kreuzvernetzender Maus-anti-human-CD3 Antikörper verwendet (Orthoklone OKT3, Janssen-Cilag, Neuss). Dieser stimuliert T-Zellen über ihren T-Zell Rezeptor und leitet darüber ihre Zellzyklusprogression und Expansion ein [87], so dass sich die Einflüsse der bakteriellen Überstände auf die Parameter der Zellaktivierung gut beobachten lassen.

Da der Antikörper hierfür an die Oberfläche der Kulturschale gebunden sein muss, wurden diese vorbereitet, indem OKT3 (1:100 verdünnt in je 1ml Borat-Puffer) in die Vertiefungen (Wells) von 24-Well-Platten (BD Labware, Heidelberg) verteilt und zwei Stunden im Brutschrank inkubiert wurde. Dann wurde die Lösung von den Wells abgesaugt und die Platte zwei mal vorsichtig mit PBS gespült.

### **2.4.2 Stimulation und Kultur von PBT**

Auf den vorbereiteten Kulturplatten wurden PBMC in Konzentrationen von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml in 2ml Complete Medium ohne P/S mit jeweils 0%, 10%, 25% oder 50%iger Verdünnung der Bakterienmedien aus 2.3 bei 37°C im CO<sub>2</sub>-gepufferten Brutschrank inkubiert.

Weil sich periphere Blut-T-Zellen über den CD2-Pfad kaum stimulieren lassen [85], wurde auf eine alternative Stimulation mit T<sub>11-2</sub> und T<sub>11-3</sub> wie bei den LPT verzichtet.

### **2.4.3 Stimulation und Kultur von LPT**

Lamina propria T-Zellen wurden wie PBT durch OKT3 aktiviert und in Konzentrationen von  $2 \times 10^6$  Zellen / ml in 2ml Complete Medium ohne P/S gehalten. Alternativ erfolgte die Aktivierung über der CD2-Rezeptor durch das lösliche, kreuzvernetzende CD2-Antikörperpaar T<sub>11-2</sub> und T<sub>11-3</sub> (überlassen von Ellis Reinherz, Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA, USA), das in Konzentrationen von 1:1000 der Zellsuspension zugegeben wurde. Wie die PBT wurden auch die LPT in 0%, 10%, 25% oder 50%igen Verdünnungen der Bakterienpräparationen aus 2.3 in Complete Medium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 72 Stunden wurde die PBT- oder LPT Zellsuspension aus den Vertiefungen der Kulturplatten abgesaugt und in 17x120mm Zentrifugenröhrchen gefüllt. Die Wells wurden je zwei mal mit kaltem PBS gespült und mikroskopisch auf Zellfreiheit kontrolliert. Die weitere Verarbeitung der Zellen fand auf Eis oder im auf 4°C gekühlten Raum statt. Die Zellen wurden zwei mal bei 1500/min je 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 10ml kaltem PBS aufgenommen um das Zellmedium herauszuwaschen. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (1500/min, 5 Minuten) und in 1ml kaltem PBS resuspendiert, gezählt und fixiert oder das Protein extrahiert.

### **2.5 Zellfixierung**

Für die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Antigene und des DNA-Gehalts wurden die Zellen in 90%igem Methanol fixiert. Die Arbeiten erfolgten auf Eis oder in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge. Von der Zellsuspension wurden  $3 \times 10^5$  Zellen abgenommen und in ein 12x75mm Röhrchen gegeben. Dessen Inhalt wurde mit 500µl kaltem PBS aufgefüllt, abzentrifugiert (1500/min, 5min) und der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 100µl kaltem PBS aufgenommen und dann tropfenweise 900µl -20°C kaltes Methanol dazugegeben. Die fixierten Zellen wurden im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

### **2.6 Proteinextraktion**

Für Western Blot Analysen wurde das Protein aus den Zellen aus 2.4.2 extrahiert. Alle Arbeiten erfolgten auf Eis oder in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge. Die Zellsuspension wurde 10 Minuten bei 1000g zentrifugiert und das Pellet in 100µl (pro

10<sup>7</sup> Zellen) Lysepuffer aufgenommen. Unmittelbar vor der Verwendung wurden dem Lysepuffer Phosphatase-Inhibitor-Cocktail, Protease-Inhibitor-Cocktail, Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor, Chymostatin und PMSF (alle Sigma Aldrich, Taufkirchen) zugesetzt. Die zu lysierenden Zellen wurden umgehend auf einem Vortex-Mixer geschüttelt und 45 Minuten auf Eis inkubiert. Alle 15 Minuten wurde erneut geschüttelt. Dann wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugieren bei 14000/min (10 Minuten) pelletiert und der Überstand in neue Probegefäße überführt. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde mit einem Lowry-Assay (Bio-Rad DC-Assay, Bio-Rad, München) photometrisch gemessen. Die Proteinextrakte wurden im Kühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

## **2.7 Protokolle für die Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie stellt ein Verfahren dar, mit dem einzelne, in Lösung befindliche Zellen aufgrund ihrer Größe, ihrer Lichtbrechungseigenschaften und ihrer Fluoreszenz unterschieden werden können. Um die Aussagekraft der Messung zu erhöhen, werden mehrere Eigenschaften simultan gemessen. Man verwendet außerdem fluorochrom-konjugierte Antikörper und Reagenzien, um Oberflächenmerkmale, Proteine, DNA-Gehalt und andere Merkmale messbar zu machen.

### **2.7.1 Färbung von extrazellulären Antigenen**

Um die Qualität der Zellpräparationen zu bestimmen, wurden von der Zellsuspension aus 2.2 routinemäßig je 5x10<sup>5</sup> Zellen abgenommen und in 12x75mm Röhrchen überführt. Sie wurden bei 1500/min für 5 Minuten zentrifugiert und die Pellets in 80µl PBS/BSA aufgenommen. Die Zellen wurden 45 Minuten mit je 20µl PE-konjugiertem CD3-Antikörper oder Maus-IgGk-PE (als Isotypkontrolle) auf Eis inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen, in PBS aufgenommen und sofort am Durchflusszytometer gemessen. Unmittelbar vor der Messung wurde Propidium Iodid im Verhältnis 1:1000 zugegeben und die PI-positiven Zellen elektronisch von der Messung ausgeschlossen, um Artefakte durch unspezifische Färbung von toten Zellen zu vermeiden. Die so gewonnenen Daten wurden mit der Software CellQuest Pro (BD Biosciences) analysiert.



### **2.7.2 Färbung von Cyklinen und Bestimmung des DNA-Gehaltes**

Die methanolfixierten Zellen aus 2.5 wurden verwendet um, intrazelluläre Antigene und den DNA-Gehalt der Zellen zu bestimmen. Dafür wurden die Zellen bei 1500UpM 5min zentrifugiert und zwei mal in PBS sowie einmal in PBS/BSA gewaschen. Dann wurden die Zellen mit dem entsprechenden Primärantikörper für 45 Minuten dunkel bei 4°C inkubiert. Eine Isotypkontrolle wurde stets mitgeführt. Handelte es sich bei dem verwendeten Primärantikörper um einen nicht konjugierten Antikörper, so erfolgte danach die Inkubation mit einem goat-anti-Mouse-Ig-FITC. Nachdem überschüssige Antikörper mit PBS herausgewaschen worden waren, erfolgte bei Bedarf die Färbung der DNA mit Propidium-Iodid um die Expression des gesuchten Antigens im Zellzyklus zu lokalisieren. Dafür wurden die Zellen in 425µl PBS/BSA aufgenommen und mit 5µl RNase A (Sigma-Aldrich) 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurden 75µl Propidium-Iodid (1mg/ml) zugegeben und die Zellen 15 Minuten auf Eis inkubiert, bevor am Durchflusszytometer gemessen wurde.

### **2.7.3 Analyse der Zellexpansion**

Um den Einfluss auf die Produktion von Tochterzellen durch Zellteilung zu verfolgen wurde ein abgewandelter Versuchsansatz benutzt: PBT wurden wie in 2.2.4 präpariert. Nach dem Zählen der Zellen wurden diese in 1 µM Carboxyfluorescein-Diazetat-Succinimidylester (CFDA-SE; Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit, Molecular Probes, bezogen über MoBiTec, Göttingen) aufgenommen und 15 Minuten bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension mit dem 5fachen Volumen Complete Medium o. P/S aufgegossen und weitere 5 Minuten dunkel inkubiert. Die Zellen wurden zwei mal in Complete Medium o. P/S gewaschen.

Je Well wurden  $2 \times 10^6$  der gefärbten Zellen in einer 24-Well-Platte in 1ml Medium für vier Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Wells waren wie in 2.4.1 mit CD3-Antikörpern beschichtet, zusätzlich wurden die Zellen mit löslichen CD28-Antikörpern (2µg/ml; Ancell, Bayport, MN, USA) und IL-2 (2µg/ml; R&D Systems, Wiesbaden) kostimuliert. Als Kulturmedium diente Complete Medium o. P/S mit 0%, 10%, 25% oder 50% vol/vol Verdünnungen der Bakterienkulturmedien aus 2.3 Es wurde eine unstimulierte Kontrolle (ohne CD3, CD28, IL-2 und Bakterienkulturüberstand) mitgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen von den Wells abgesaugt und in 12x75mm Röhrchen überführt. Dann wurden sie zwei mal in kaltem PBS gewaschen und für 15 Minuten in 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen in PBS aufgenommen und schließlich am Durchflussszytometer gemessen.

#### **2.7.4 Analyse der DNA-Replikation**

Die DNA-Synthesezeit und potentielle Verdopplungszeit wurden durch Messung des Einbaus von Bromodeoxyuridin (BrdU) während der S-Phase des Zellzyklus gemessen. Dabei gibt man einer proliferierenden Zellkultur für eine Stunde BrdU zu, dessen Einbau in die DNA später durchflussszytometrisch gemessen werden kann. Durch simultane Messung des DNA-Gehalts kann später rechnerisch die Geschwindigkeit der DNA-Synthese bestimmt werden.

Dafür wurde den Zellen aus 2.4.2 nach drei Tagen Zellkultur mit den unterschiedlichen Konzentrationen von Bakterienkulturüberstand 20µM BrdU zugesetzt, welches von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut wurde. Nach 60 Minuten wurde es aus dem Medium herausgewaschen und durch Thymidin ersetzt, um einen weiteren Einbau von BrdU zu verhindern. Um die markierten Zellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus zu messen, wurden die Zellen zu definierten Zeitpunkten von den Kulturplatten abpipettiert und wie oben beschrieben in Methanol fixiert (siehe 2.5). Die so in Abhängigkeit von ihrer Replikationsaktivität mit BrdU markierten Zellkerne wurden dann mit einem gegen BrdU gerichteten und fluorchrommarkierten Mausantikörper sowie Propidium Iodid für die Analyse im Durchflussszytometer vorbereitet.

Damit der Antikörper an BrdU-markierte Nukleinsäuren binden kann, musste die DNA zuerst denaturiert werden. Hierfür wurden alle Proben, nachdem diese in PBS gewaschen waren, in 500µl 4N HCl mit 0,5% Triton X-100 aufgenommen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Waschdurchgang mit PBS/BSA wurden die Zellen in Boratpuffer aufgenommen, weitere zwei Minuten inkubiert und erneut in PBS/BSA gewaschen. Für die eigentliche Färbung wurden pro Probe 20µl anti-BrdU-FITC und 30µl PBS-BT zugegeben. Die Markierung der DNA mit Propidium Iodid erfolgte im Anschluss wie oben beschrieben.

Die mathematische Analyse der so gewonnenen Ergebnisse wurde nach den Methoden von Begg *et al.* [88] und White *et al.* [89] statt. Die relative Bewegung von Zellen in der S Phase im Verhältnis zur G1 Phase und G2-M-Phase wurde wie folgt errechnet:

$$RM_{(t)} = \frac{F_{S(t)} - F_{G1(t)}}{F_{G2+M(t)} - F_{G1(t)}}$$

Dabei entspricht RM der relativen Bewegung im Zellzyklus;  $F_{G1}$  = durchschnittliche PI-Fluoreszenz der BrdU-negativen Zellen in G1;  $F_{G2+M}$  = durchschnittliche PI-Fluoreszenz der BrdU-negativen Zellen in G2+M,  $F_S$  = durchschnittliche PI-Fluoreszenz der BrdU-markierten Zellen, jeweils zum Zeitpunkt t.

Die Dauer der S-Phase ( $T_S$ ) wurde berechnet als die benötigte Zeit für eine relative Bewegung von einer Einheit. Daraus lässt sich die potentielle Verdopplungszeit ( $T_{pot}$ ) mit nachfolgender Formel berechnen:

$$T_{pot} = T_S \ln(2) / v$$

wobei v definiert ist als  $\ln[1 + flu_{(t)} / 1 - fld_{(t)} / 2]$ ;  $flu_{(t)}$  = Fraktion der BrdU-positiven, ungeteilten Zellen zum Zeitpunkt t;  $fld$  = Fraktion der BrdU-positiven, geteilten Zellen zum Zeitpunkt t.

### 2.7.5 Apoptosemessung mit Annexin V

Um die Auswirkungen der Bakterienmedien auf die Apoptoserate von Zellen zu messen, wurde Annexin V-FITC verwendet. Annexin V bindet an Phosphatidylserin, welches in der frühen Apoptose (sowie in der Nekrose) vom inneren zum äußeren Blatt der Plasmamembran transloziert. Wenn Annexin V mit einem Fluorochrom konjugiert ist, kann man mit seiner Hilfe den Anteil der apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer messen. Um apoptotische von nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, muss gleichzeitig eine Färbung mit Propidiumiodid erfolgen. Die Zellen, die Annexin V positiv und PI negativ sind, führen gerade eine Apoptose durch [90].

Zellen aus 2.4.2 wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend in Annexin Bindungspuffer  $10^6$  Zellen pro ml aufgenommen. Davon wurden jeweils 100µl in ein Röhrchen gegeben und mit 5µl Annexin V-FITC und 10µl PI 15 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen mit weiteren 400µl Bindungspuffer aufgefüllt und sofort am Durchflusszytometer gemessen.

### **2.7.6 Messung der Zytokinsekretion**

Um die Zytokinsekretion von PBT unter dem Einfluss von EcN-CM zu messen wurden die Konzentrationen von IL-2, IL-4, IL-10, TNF $\alpha$  sowie IFN $\gamma$  im Zellkulturüberstand gemessen. Dafür wurde die Zellsuspension aus 2.4 zentrifugiert (1500/min x 10min) und anschließend der Überstand vorsichtig abpipettiert ohne das Pellet aufzumischen. Der so gewonnene Zellkulturüberstand wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Messung der Zytokinkonzentrationen erfolgte mit dem *Cytometric Bead Array* Kit (CBA, BD Biosciences, Heidelberg) und wurde entsprechend den sehr detaillierten Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Das Cytometric Bead Array stellt eine Methode dar, in der lösliche Substanzen ähnlich einem Sandwich-ELISA mittels Antikörperbindung an ein Trägermedium gebunden und dann mit einem weiteren Nachweisantikörper markiert und gemessen werden. Im Unterschied zum ELISA handelt es sich beim Trägermedium jedoch um suspendierte Glasperlen, so dass die anschließende Messung im Durchflusszytometer stattfinden kann. Die mit Antikörpern gegen bis zu sechs verschiedene gelöste Antigene (in diesem Fall Zytokine) beschichteten Perlen unterscheiden sich in ihrer Fluoreszenzintensität, so dass man sie gleichzeitig messen und bei der Analyse der Daten mittels einer speziellen Software voneinander unterscheiden kann. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgt, indem eine Standardkurve mit bekannten Zytokinkonzentrationen angelegt und mit der Fluoreszenzintensität der Nachweisantikörper verglichen wird.

## **2.8 Western Blot Analyse**

Die Proteinextrakte aus 2.6 wurden für die Dauer der Arbeit auf Eis gelagert und danach unmittelbar wieder bei -20°C eingefroren. Für Western Blots wurden je Probe 15µg Protein eingesetzt. Die entsprechende Menge Proteinextrakt wurde mit Sample Buffer und aqua dest. auf ein Volumen von 17,5µl gebracht und 10 Minuten bei 85°C in einem Blockheizgerät denaturiert. Dann wurden die Proben in die Taschen des Elektrophoresegels (NuPAGE BIS-TRIS 4-12%, Invitrogen, Karlsruhe) pipettiert und ca. 50 Minuten bei 200V in einer Elektrophoresekammer (Novex XCell II, San Diego, CA, USA) elektrisch aufgetrennt. Das Gel wurde dann 60 Minuten bei 30V auf eine

Nitrocellulosemembran (Invitrogen, Karlsruhe) geblottet. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4°C auf einem Schwenker in Blocking Buffer geblockt. Nach 12h wurde die Membran 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem entsprechenden Primärantikörper (nach Herstellerempfehlung verdünnt in 5%iger Trockenmilch) geschwenkt. Danach wurde die Membran 5x kurz, 3x5 Minuten und 2x20 Minuten in Waschpuffer gewaschen. Der Meerrettichperoxidasekonjugierte Sekundärantikörper wurde 1:1000 verdünnt in 5%iger Trockenmilch für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert, bevor die Membran erneut wie oben beschrieben gewaschen wurde. Nach einer Minute Inkubation mit dem Chemilumineszenzsubstrat (PerkinElmer Life Sciences, Rodgau-Jügesheim) wurde mit der Membran in der Dunkelkammer ein Film (Amersham Biotech Ltd., Freiburg i.Br.) belichtet und entwickelt.

### 3 ERGEBNISSE

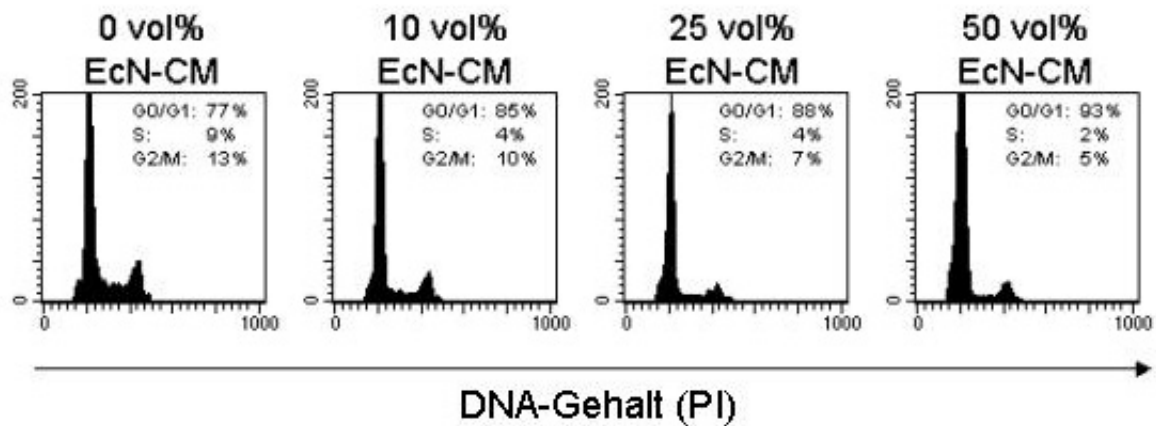
In verschiedenen doppelblind-randomisierten placebokontrollierten Studien konnte ein therapeutischer Effekt von EcN in der Behandlung der Colitis ulcerosa und Pouchitis nachgewiesen werden. Der Mechanismus dieser Wirkung bleibt bisher unklar. In der Pathogenese dieser Erkrankungen spielen T-Zell-vermittelte Entzündungsvorgänge eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit wurde daher der Einfluss von bakteriellen Kulturüberständen des *E. coli* Nissle 1917 auf verschiedene Parameter der T-Zellfunktion untersucht.

#### ***3.1 Einfluss von EcN auf die Zellzyklusprogression von PBT***

##### **3.1.1 Zellzyklusverteilung**

Für die Reaktion des Immunsystems auf pathogene Reize ist eine suffiziente Aktivierung von T-Lymphozyten essentiell. Aktivierte T-Zellen durchlaufen den Zellzyklus, in dem sie ihre DNA verdoppeln und sich schließlich teilen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen zu einer Überstimulation von T-Zellen kommt. Es wurde daher zunächst ein möglicher Einfluss von EcN-Kulturüberständen auf die Zellzyklusprogression von aktivierten peripheren T-Zellen untersucht. Dafür wurden periphere T-Zellen für drei Tage über ihren T-Zellrezeptor stimuliert und mit 0, 10, 25 und 50 vol/vol% Konzentrationen sterilfiltrierter Bakterienkulturüberstände (EcN-CM) kultiviert. Anschließend folgte die Färbung der DNA mit Propidium Iodid (PI) und die durchflusszytometrische Messung der Zellzyklusprogression.

Aus Abb.1 ist ein dosisabhängiger hemmender Effekt von EcN-CM auf die Zellzyklusprogression von PBT zu erkennen. Während sich bei den ohne EcN-CM stimulierten PBT 77% der Zellen in der G1 Phase des Zellzyklus befinden, wächst diese ruhende Fraktion über 85% bei 10%igem EcN-CM und 88% bei 25%igem EcN-CM auf 93% in der Kultur mit 50%ig verdünntem Bakterienkulturüberstand. Dagegen nimmt der Anteil von Zellen in S- und G2/M-Phase des Zellzyklus dosisabhängig von 9% (bzw. 13%) auf 2% (bzw. 5%) ab. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse aus zehn Versuchsansätzen.



**Abb. 1:** Einfluss von EcN-CM auf die Zellzyklusverteilung von CD3-aktivierten PBT im DNA-Histogramm. Zellen in der G0/G1-Phase des Zellzyklus besitzen einen einfachen Chromosomensatz (G0/G1-Peak im DNA-Histogramm). Nach Aktivierung des T-Zellrezeptors durchlaufen die Zellen den Zellzyklus und treten zunächst in die S- dann in die G2-Phase ein. In der G2/M Phase haben die Zellen ihren Chromosomensatz verdoppelt und bewirken einen G2/M-Peak im DNA-Histogramm [91]. EcN-CM hemmt dosisabhängig die Zellzyklusprogression von CD3-stimulierten PBT.

### 3.1.2 DNA-Synthesezeit und potentielle Verdopplungszeit

Um die funktionelle Relevanz dieses Effektes beurteilen zu können wurde die Zellzykluskinetik mittels BrdU-Färbung und Berechnung der potentiellen Verdopplungszeit gemessen [92].

**Tabelle 1:** Potentielle Verdopplungszeit ( $T_{\text{pot}}$ ) von CD3-stimulierten PBT mit 25 bzw. 50%igen Verdünnungen von EcN-Kulturüberständen.

% EcN-CM	$T_{\text{pot}}$
0%	$24.7 \pm 2.4\text{h}$
25%	$37.0 \pm 4.9\text{h}$
50%	$88.2 \pm 9.6\text{h}$

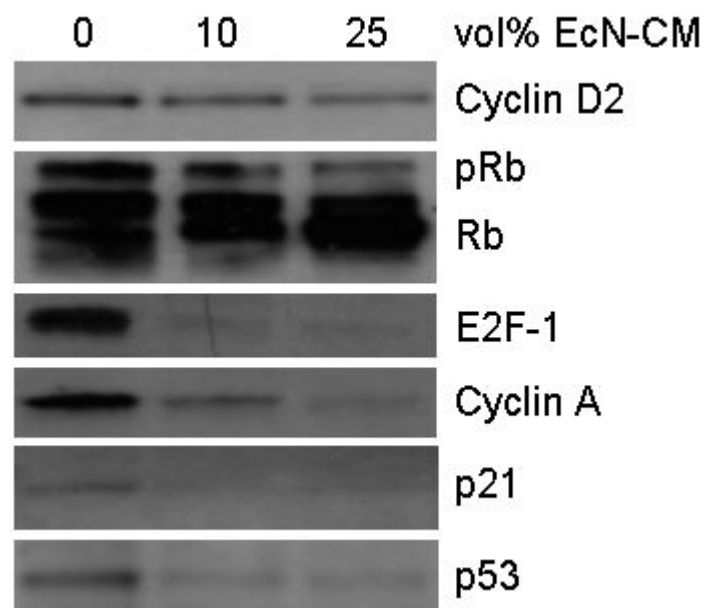
Es zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt auf die DNA-Replikation. Die Zeit, die CD3-stimulierte PBT für die Synthesephase benötigten, war in Gegenwart von EcN-Kulturüberständen wesentlich verlängert. Während CD3 stimulierte T-Zellen im Mittel in 24,7h ihre Zellpopulation verdoppelten, benötigten die Zellen, die zusätzlich mit EcN-CM kultiviert wurden, dafür 37h bzw. 88,2h.

## 3.2 Modulation von Zellzyklusregulatoren durch EcN

Nachdem gezeigt werden konnte, dass bakterielle Kulturüberstände von EcN die Zellzyklusprogression und die Zellkinetik von peripheren T-Zellen modulieren, wurde der Einfluss von EcN-CM auf die Expression von wichtigen Zellzyklusregulatoren untersucht.

### 3.2.1 Cyklin D2 und Retinoblastomprotein

Cykline sind die Schlüsselregulatoren des Zellzyklus. In Abhängigkeit von der Expression bestimmter Cykline werden Substrate phosphoryliert, die den Übergang der Zelle von einer Phase des Zellzyklus in die nächste bewirken. Eine vollständige Charakterisierung der Substrate bleibt noch Gegenstand der Forschung, aber einige, wie zum Beispiel das Retinoblastomprotein (Rb) sind lange bekannt. Die Expression von Cyklinen erfolgt zyklisch und in spezifischen Phasen des Zellzyklus [93].



**Abb. 2: Expression von Zellzyklusregulatoren in stimulierten PBT unter 0, 10 und 25%igen Konzentrationen von EcN-CM (Western Blot). Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse aus drei verschiedenen Versuchsansätzen.**

Cykline der D-Familie werden nach mitogener Stimulation von Lymphozyten in der G1-Phase exprimiert und bewirken den Übertritt der Zellen in die Synthesephase. Wie man in Abb.2 beobachten kann, war in CD3-stimulierten peripheren T-Lymphozyten ein deutliches Signal des gegen Cyklin D2 gerichteten Antikörpers nachzuweisen. Dieses nahm jedoch mit ansteigenden Konzentrationen des



bakteriellen Kulturüberstandes deutlich ab, was auf einen verminderten Übertritt von Zellen in den Zellzyklus hinweist.

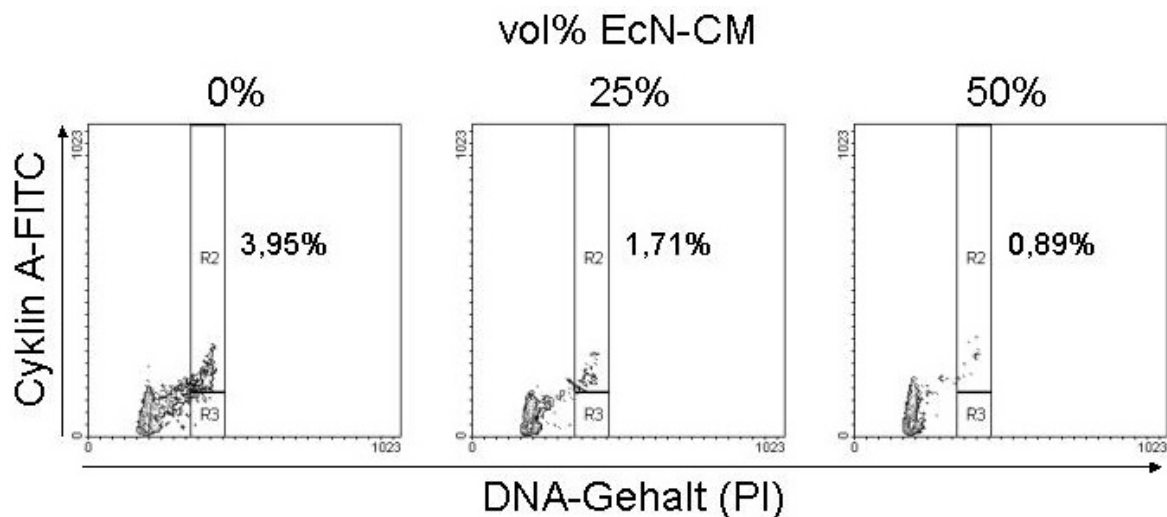
In Abb.2 erkennt man außerdem die Expression von Rb in verschiedenen Stadien der Phosphoryllierung: die untere der drei Banden ist jeweils das unphosphoryllierte (aktive, zellzyklusprogressionshemmende), die darüber liegenden Signale repräsentieren das einfach, bzw. zweifach phosphorylierte Protein (pRb bzw. ppRb).

Während Rb in stimulierten Lymphozyten ohne Bakterienmedium hauptsächlich in phosphorylierter Form vorlag (linke Spur), vermochte der Überstand der Bakterienkultur von EcN das Gleichgewicht dosisabhängig zu der unphosphorylierten Form des Proteins zu verschieben.

Retinblasomaprotein (Rb) ist ein Tumorsuppressorgen. Es bindet in der unphosphorylierten Form an Transkriptionsfaktoren und inaktiviert sie, wodurch das Passieren des G1/S Überganges verhindert wird [94]. Cyklin D bewirkt zusammen mit den Cyklin-abhängigen-Kinasen (CDK) 4 und 6 die Phosphorylierung des Retinoblastomaproteins, so dass Transkriptionsfaktoren wie z.B. E2F den Komplex mit Rb verlassen und letztendlich das Fortschreiten im Zellzyklus ermöglicht wird. Der hier gezeigte hemmende Effekt von EcN-CM auf die Cyklin D Expression bewirkt daher eine verminderte Aktivität der Rb-abhängigen Transkriptionsfaktoren und dadurch einen verlangsamten Übertritt von Zellen in die S-Phase.

### **3.2.2 Cyklin A und E2F**

Die Expression des Cyklin A erfolgt im Verlauf der S- und G2-Phase und ist wie die des Transkriptionsfaktors E2F eine Folge der Rb-Phosphoryllierung. In diesem Sinne geben Cyklin A und E2F die funktionelle Relevanz des Effektes von EcN-CM auf die Cyklin D-Expression wieder.



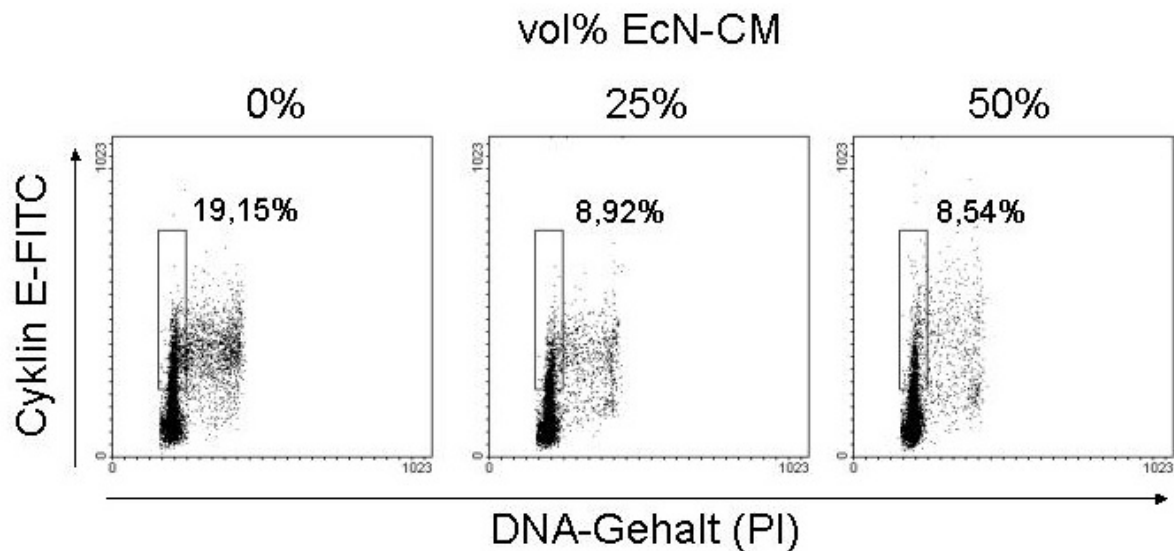
**Abb. 3: Expression von Cyklin A in Relation zum DNA-Gehalt.** Auf der X-Achse findet sich der DNA-Gehalt, die Y-Achse repräsentiert die Cyklinexpression. In stimulierten Lymphozyten (linke Abbildung) steigt der Cyklin A-Gehalt im Verlauf der S-Phase an und wird gegen Ende der G2-Phase abgebaut. Die mit R2 beschriftete Region und die Prozentangaben entsprechen den Cyklin A-positiven Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus.

EcN-CM vermochte die Expression von E2F (Abb. 2) und die Synthese von Cyklin A (Abb. 2 und 3) in stimulierten, peripheren T-Zellen dosisabhängig zu hemmen.

E2F ist ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor, der an vielen Vorgängen in einer sich teilenden Zelle beteiligt ist. Die Hemmung seiner Expression sollte daher unmittelbare Auswirkung auf die Expansion von stimulierten T-Lymphozyten haben.

### 3.2.3 Cyklin E

Cyklin E beginnt in proliferierenden Zellen im Verlauf der G1 Phase zu akkumulieren und wird beim Eintritt in die Synthesephase maximal exprimiert. Danach erfolgt ein beständiger Abbau des Proteins, so dass Zellen in G2 mehrheitlich Cyklin E negativ sind.

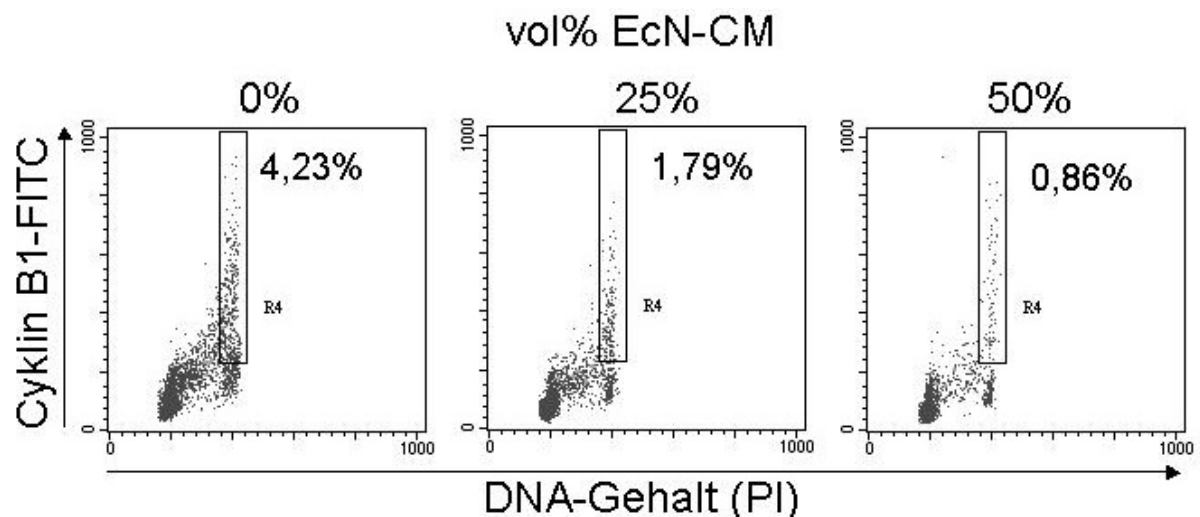


**Abb. 4: Expression von Cyklin E in der G0/G1-Phase des Zellzyklus. Die X-Achse gibt den DNA-Gehalt, die Y-Achse die Expression von Cyklin E wieder. Mitogen stimulierte PBT exprimieren Cyklin E in der G1-Phase maximal, im Verlauf der S-Phase erfolgt ein Abbau des Proteins. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil Cyklin E-positiver Zellen in der G1-Phase an der Gesamtheit der gemessenen Zellen.**

Abbildung 4 zeigt den Einfluss von EcN-CM auf die Expression von Cyklin E im Verlauf des Zellzyklus. Man erkennt neben dem typischen Expressionsmuster des Cyklins bei stimulierten Lymphozyten eine deutliche, dosisabhängige Hemmwirkung des bakteriellen Kulturüberstandes auf die Cyklin E-Expression während der G1 Phase.

### 3.2.4 Cyklin B1

Cyklin B1 ist ein Protein, das spät in die Regulation des Zellzyklus eingreift. Es bewirkt den Eintritt in die Mitose nachdem Zellen den G1/S-Restriktionspunkt passiert haben.



**Abb. 5: Expression von Cyclin B1 im Verlauf des Zellzyklus. X-Achse: DNA-Gehalt; Y-Achse: Cyclin B1- Expression. Zellen in der G0/1-Phase des Zellzyklus sind Cyclin B1-negativ. Mit Eintritt in die S-Phase akkumuliert Cyclin B1 und erreicht seine maximale Expression in der G2-Phase.**

In der Durchflusszytometrie ist Cyclin B1 ein guter Marker für in Teilung befindliche Zellen. Messereignisse, die einen doppelten Chromosomensatz haben und Cyclin B1 exprimieren, kann man als Zellen in oder kurz vor einer Mitose interpretieren.

Auch für dieses Regulationsprotein konnte ein hemmender Einfluss durch EcN-CM gezeigt werden (Abb.5). Lymphozyten, die über ihren T-Zellrezeptor mitogen stimuliert wurden, exprimierten Cyclin B1 in der G2/M-Phase maximal. Unter Zugabe ansteigender Konzentrationen von EcN-CM zum Zellkulturmedium konnte ein dosisabhängiger, hemmender Effekt auf die Cyclin B1-Expression, und damit auf die Größe der den Zellzyklus durchlaufenden Zellfraktion gezeigt werden.

### 3.2.5 Expression von Zellzyklusinhibitoren

Um die Untersuchungen auf Proteinebene zu vervollständigen, wurde der Einfluss von EcN-CM auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p53 untersucht. Beide Inhibitoren hemmen die Wirkung der Cykline über unterschiedliche Stoffwechselwege. p53 ist weiterhin als wichtiger Regulator in die Apoptose von T-Zellen involviert und ist für die unterschiedliche Zellkinetik von peripheren und Lamina propria T-Zellen mit verantwortlich [85].

Interessanter Weise konnte auch durch hohe Konzentrationen von EcN-CM im Kulturmedium kein Anstieg der Expression beider Zellzyklusinhibitoren erreicht

werden (Abb. 2). Die gehemmte Zellzyklusprogression von peripheren T-Zellen durch bakterielle Zellkulturüberstände kann demnach nicht durch eine stärkere Expression der beiden Inhibitoren p21 und p53 erklärt werden.

### **3.3 Einfluss von *E. coli* Nissle 1917 auf den Zelltod von PBT**

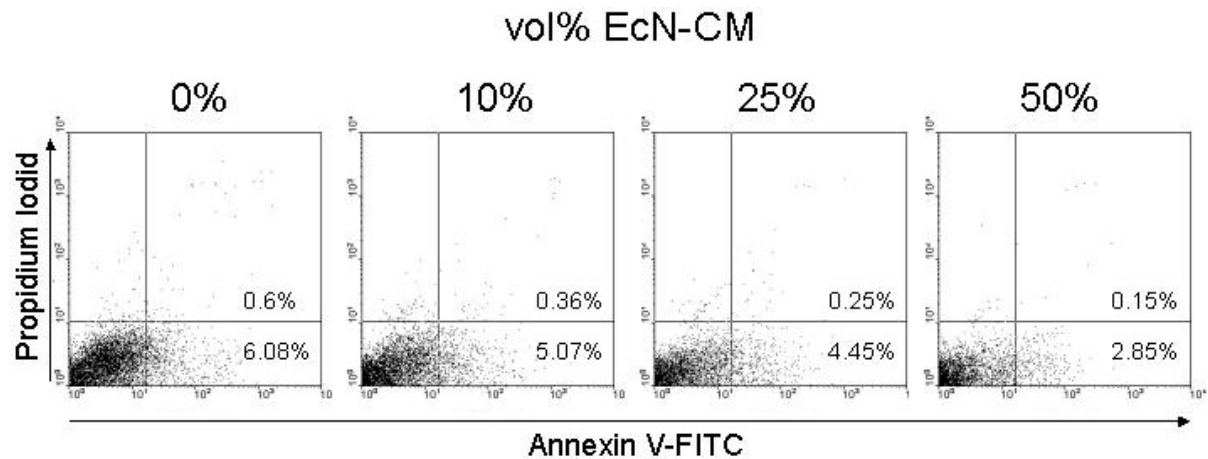
Da Zellzyklus und Apoptose von T-Zellen eng miteinander verwoben und beide für eine physiologische Wirtsabwehr unverzichtbar sind, wurde untersucht, ob *E. coli* Nissle 1917-Kulturüberstände einen modulierenden Einfluss auf die Apoptose von peripheren T-Zellen ausüben.

#### **3.3.1 Subdiploider DNA-Gehalt und Annexin V**

Einen ersten Überblick über den Zelltod in der Kultur erlaubt die Messung der Zellfraktion mit subdiploidem DNA-Gehalt im DNA-Histogramm. Apoptotische und nekrotische Zellen erkennt man im DNA-Histogramm als Messereignisse mit einem DNA-Gehalt, der kleiner ist als dem der Zellen in G1, da während des Zelltodes ein Kernzerfall und eine DNA-Spaltung stattfindet.

Aus den DNA-Histogrammen in Abb.1 ergeben sich keine Unterschiede der Fraktion von Zellen mit subdiploidem DNA-Gehalt in unterschiedlichen Konzentrationen von EcN-CM und daher keine Hinweise auf einen Einfluss von *E. coli* Nissle 1917 auf den Zelltod von aktivierten peripheren T-Zellen.

Die Messung des subdiploiden DNA Gehalts ist jedoch für die Apoptosemessung eine verhältnismäßig unspezifische Methode. Um die Population apoptotischer Zellen genauer zu quantifizieren wurden daher Annexin V-Färbungen durchgeführt. Bei dieser Methode wird ein Zellwandphospholipid nachgewiesen, das von apoptotischen und nekrotischen Zellen auf der Aussenseite der Zellmembran präsentiert wird (siehe auch 2.7.5). Analog zu den vorherigen Experimenten wurden dafür T-Zellen aus peripherem Blut isoliert und für drei Tage in 0, 10, 25 oder 50%igen Konzentrationen von EcN-CM inkubiert, während sie über den CD3-Rezeptor aktiviert wurden.

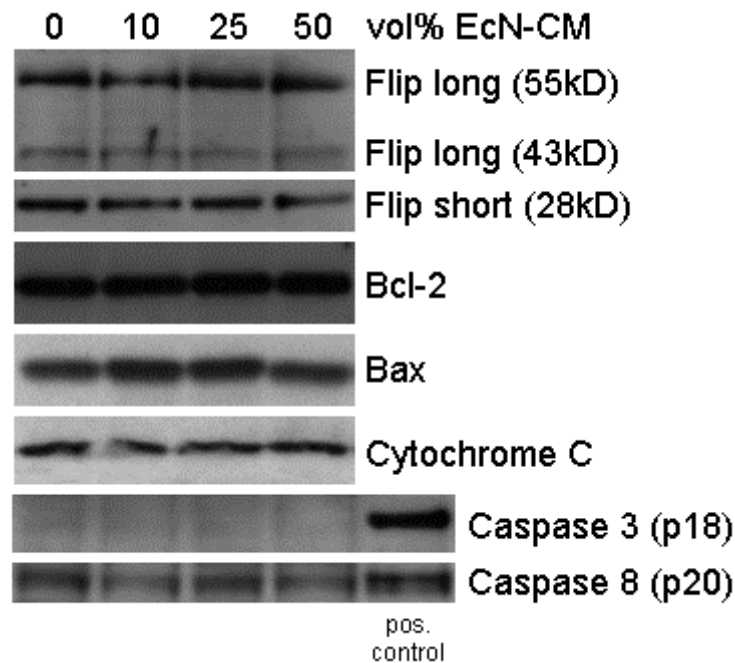


**Abb. 6: Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von EcN-CM auf die Apoptoserate von CD3-stimulierten PBT im Annexin V-FACS.** Durch die simultane Färbung von nekrotischen Zellen mit Propidium Iodid kann zwischen diesen Populationen unterschieden werden: Lebende Zellen sind Annexin- und PI-negativ (linker unterer Quadrant). Nekrotische Zellen sind Annexin- und PI-positiv (rechter oberer Quadrant), während Apoptotische Zellen Annexin-positiv und PI-negativ sind (rechter unterer Quadrant).

Wie aus Abb.6 hervor geht, bewirkt EcN-CM keine Vergrößerung des Anteils apoptotischer Zellen in den Kulturen. Eine direkte Induktion von Apoptose in T-Zellen durch bakterielle Kulturüberstände von *E. coli* Nissle 1917 konnte daher nicht nachgewiesen werden.

### 3.3.2 Expression von apoptoseassoziierten Proteinen

Dennoch könnte der Zelltod von T-Zellen durch EcN auf unterschiedlichen Wegen initiiert und in den durchgeführten Experimenten durch unbekannte Faktoren unterbrochen worden sein. Deshalb wurde die Expression von Schlüsselproteinen der Apoptoseregulation im Western Blot überprüft.



**Abb. 7:** Einfluss von EcN-Kulturüberständen auf die Expression von Schlüsselproteinen des extrinsischen und intrinsischen Apoptoseweges. PBMC wurden für drei Tage mit den entsprechenden Konzentrationen von EcN-CM inkubiert und über den CD3-Rezeptor stimuliert. Danach wurden die Zellen gewaschen und das Protein extrahiert. Die Bilder zeigen typische Ergebnisse von drei Versuchsansätzen.

Wie aus den Western Blots in Abb.7 ersichtlich ist, ergaben sich keine Unterschiede in der Expression pro- oder antiapoptotischer Proteine in PBMC, die CD3-stimuliert und mit unterschiedlichen Konzentrationen von EcN-CM inkubiert worden waren. Weder waren geänderte Konzentrationen von Bcl-2, Bax oder Cytochrom C im Zelllysate nachweisbar, noch wurden Caspase 3 oder 8 oder FLIP vermehrt zu aktiven Formen gespalten.

### **3.4 Modulation der Expansion von peripheren T-Zellen**

Die Summe der zuvor untersuchten Signalwege und Stoffwechselaktivitäten bestimmt die Fähigkeit von T-Lymphozyten, auf einen rezeptorvermittelten Stimulus mit Zellteilung und Expansion der Population zu reagieren. Um die Frage zu beantworten, ob bakterielle Kulturüberstände von *E. coli* Nissle 1917 diese Fähigkeit beeinflussen können, wurde die Expansion und Tochterzellgeneration von mitogen stimulierten peripheren, CFDA-gefärbten T-Zellen in An- und Abwesenheit von EcN-CM untersucht.

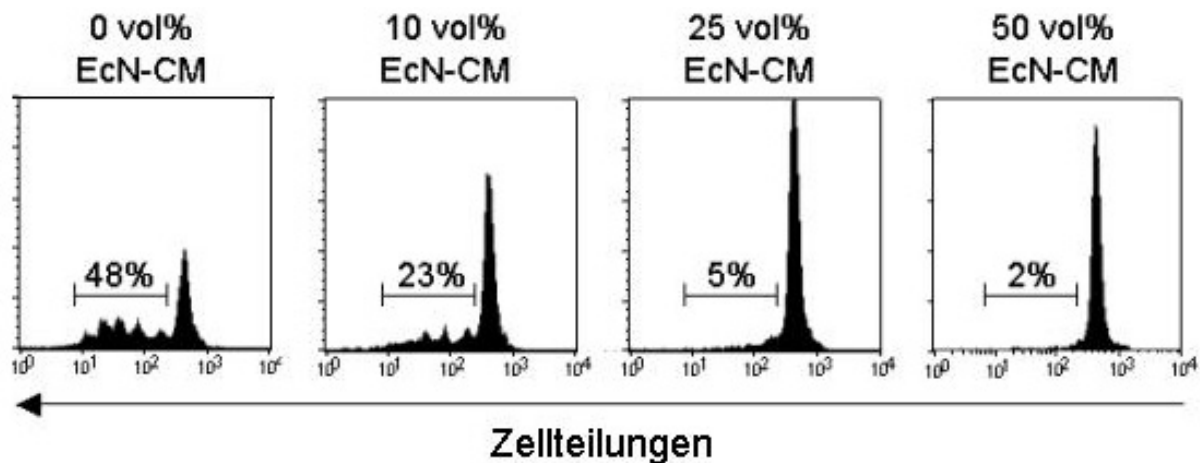


Abb. 8: Expansion von CD3+IL-2+CD28 stimulierten PBT. Histogrammdarstellung, auf der x-Achse ist der CFDA-Gehalt der Zellen dargestellt. CFDA ist ein Vitalfarbstoff, der von der Mutterpopulation zu ungefähr gleichen Anteilen auf die beiden Tochterzellen weitergegeben und durch Fluoreszenzmessung nachgewiesen werden kann. Von links nach rechts ohne und in Anwesenheit von 10, 25 und 50%igen Konzentrationen von EcN-CM. Der rechte Peak in den Histogrammen markiert die Mutterzellpopulation, nach links folgen die Peaks der 1.-5. Tochterzellgeneration.

Nach vier Tagen Stimulation mit anti-CD3, IL-2 und CD28 erkennt man in Abb. 8 links die Expansion der Zellpopulation, von der sich 48% geteilt und bis zu fünf Tochterzellgenerationen erzeugt haben. Schon mit 10%iger Konzentration von EcN-CM im Kulturmedium und gleichbleibender Zellaktivierung geht der Anteil der expandierten Zellen auf 23% zurück und Konzentrationen von 25 und 50% resultierten in einer annähernd kompletten Depression der Expansion von PBT.

### **3.5 Einfluss von *E. coli* Nissle 1917 auf die Apoptose, Zellzyklusverteilung und Expansion von Lamina propria T-Zellen und andere T-Zell Subpopulationen**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Kulturüberstände von *E. coli* Nissle 1917 die Zellzyklusprogression und Expansion von peripheren T-Zellen inhibieren, wurde dessen Einfluss auf LPT untersucht. LPT sind eine Population von Effektor- und Memory-T-Zellen, die sich in Hinsicht auf ihr Zellzyklus- und Apoptoseverhalten von peripheren T-Zellen deutlich unterscheiden [85]. Sie bilden die vorderste Verteidigungslinie bei der Wirtsabwehr und haben eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [83].



### 3.5.1 Zellzyklusverteilung von Lamina propria T-Zellen

Frisch isolierte LPT wurden mit CD3- bzw. CD2-Antikörpern für 72 Stunden aktiviert. Danach befanden sich  $91 \pm 3,1\%$  (CD3) bzw.  $92 \pm 2,9\%$  (CD2) der Zellen in der G0/G1-Phase, während  $9 \pm 1\%$  bzw.  $8,1 \pm 1,6\%$  der Zellen in den Zellzyklus eingetreten waren und sich in der S- oder G2/M-Phase befanden. Im Gegensatz zu den PBT änderte sich an diesen Verhältnissen unter Zugabe von 10, 25 oder 50%igen Konzentrationen von EcN-CM nichts: selbst in der Kultur mit 50%iger Verdünnung der bakteriellen Kulturüberstände fand noch eine deutliche Zellzyklusprogression statt.

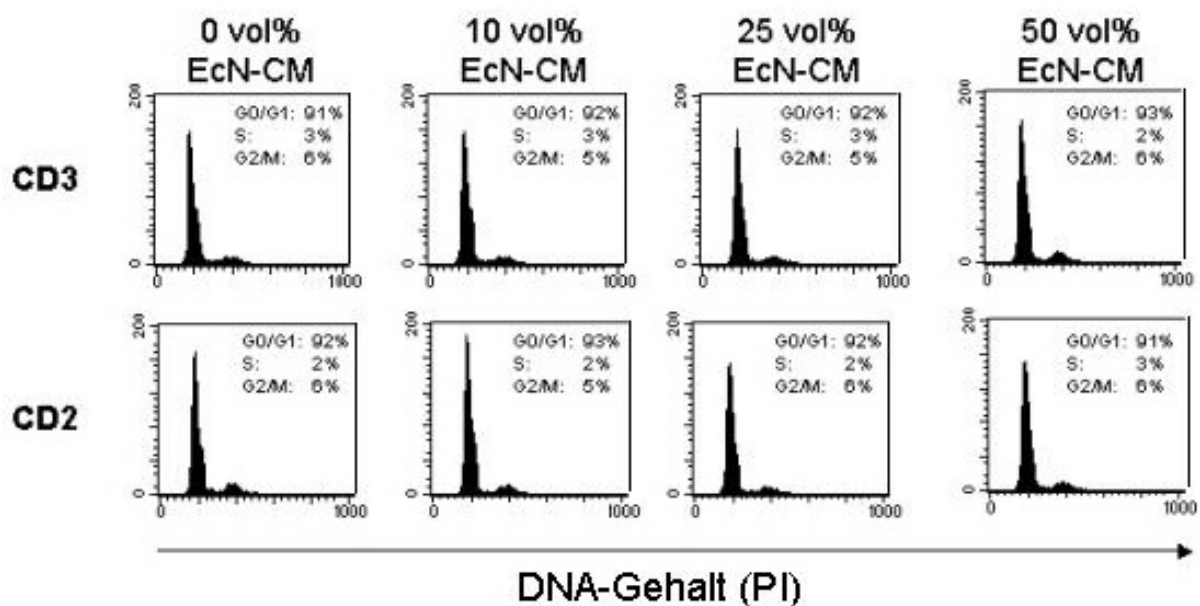
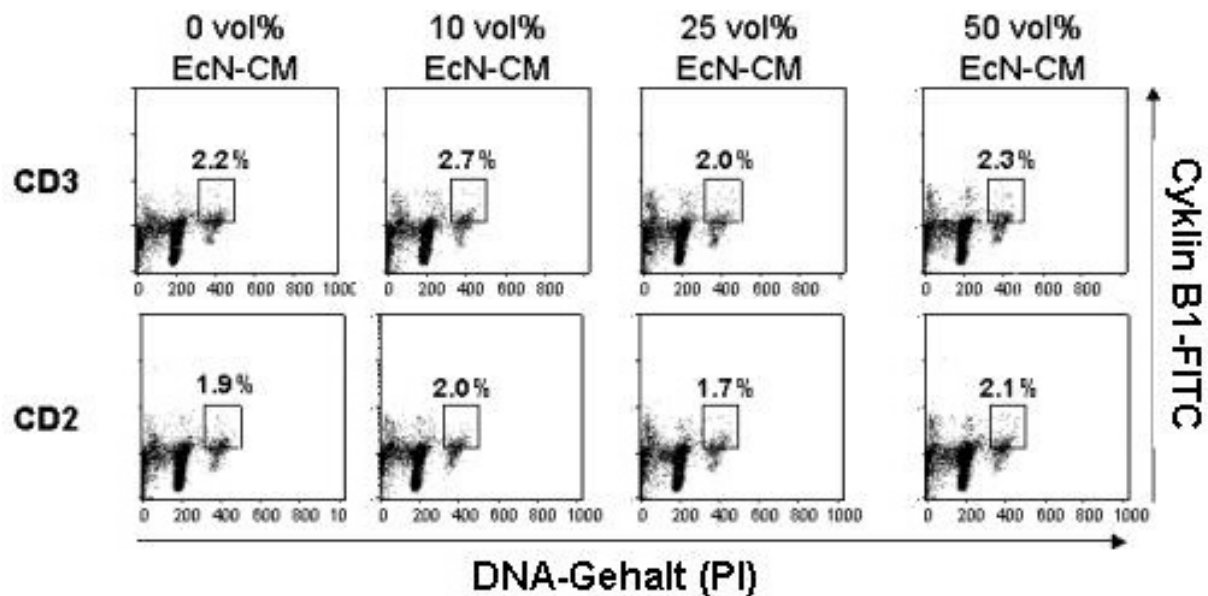


Abb. 9: Zellzyklusverteilung von Lamina propria T-Zellen. Die Zellen wurden über den CD3-Rezeptor (obere Reihe) bzw. CD2-Rezeptor (untere Reihe) in den entsprechenden Konzentrationen von EcN-CM stimuliert. Nach drei Tagen erfolgte die durchflusszytometrische Messung des DNA-Gehalts. Zugabe von bakteriellen Kulturüberständen hatte keinen hemmenden Einfluss auf die Zellzyklusprogression.

### 3.5.2 Cyklinexpression von Lamina propria T-Zellen

Die fehlende Beeinflussung des LPT-Zellzyklus durch *E. coli* Nissle 1917 konnte bestätigt werden, indem die Expression von Cyclin B1 in LPT gemessen wurde.

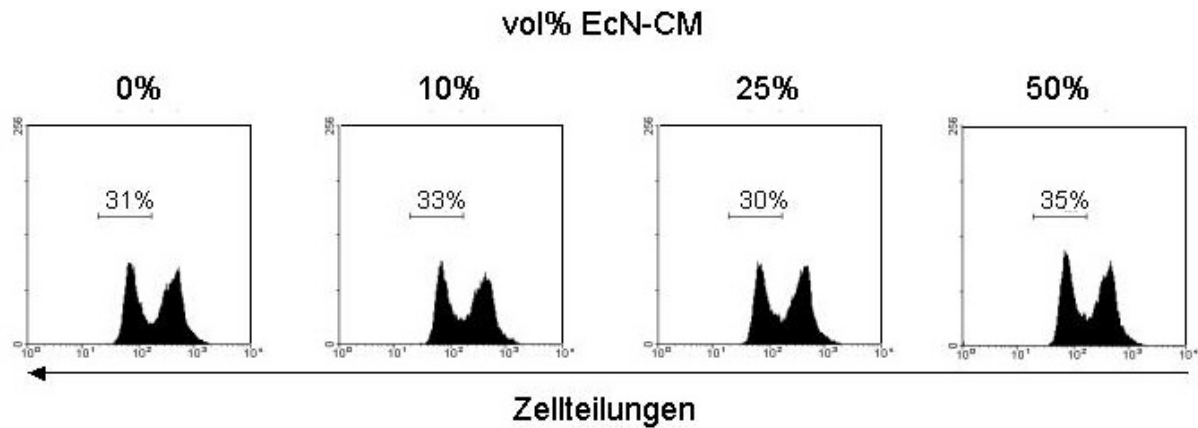


**Abb. 10:** Expression von Cyclin B1 (Y-Achse) im Verlauf des Zellzyklus (DNA-Gehalt, X-Achse) in LPT. Die Zellen wurden mit CD3- (oben) oder CD2-Antikörpern (unten) stimuliert. Ansteigende Konzentrationen von EcN-CM im Kulturmedium hatten keinen Einfluss auf den Eintritt der Zellen in die G2/M-Phase.

Wie aus Abbildung 10 hervor geht, hatte selbst die höchste getestete Konzentration des Bakterienüberstandes keine hemmende Wirkung auf den Eintritt von LPT in die G2/M-Phase des Zellzyklus, während die selbe Konzentration in PBT eine Hemmung der Cyclin B1-Expression in G2/M um mehr als 90% bewirkte (siehe Abb. 5).

### 3.5.3 Zellexpansion von Lamina propria T-Zellen

Analog zu den Versuchen mit PBT wurde die Expansion von LPT für die verschiedenen Konzentrationen von EcN-CM durch CFDA-Färbung gemessen. Dabei hatten nach Stimulation mit CD3 + CD28 + IL2 bzw CD2 + CD28 +IL-2 für vier Tage 31-35% der Zellen expandiert und dabei eine Tochterzellgeneration hervor gebracht. Zugabe des bakteriellen Kulturüberstandes bewirkte keine Hemmung der Zellexpansion von LPT: während PBT in vergleichbaren Kulturbedingungen die Expansion fast vollständig einstellten, konnten LPT auch in Anwesenheit von 50%igem EcN-CM offensichtlich ungehindert expandieren und Tochterzellen generieren.

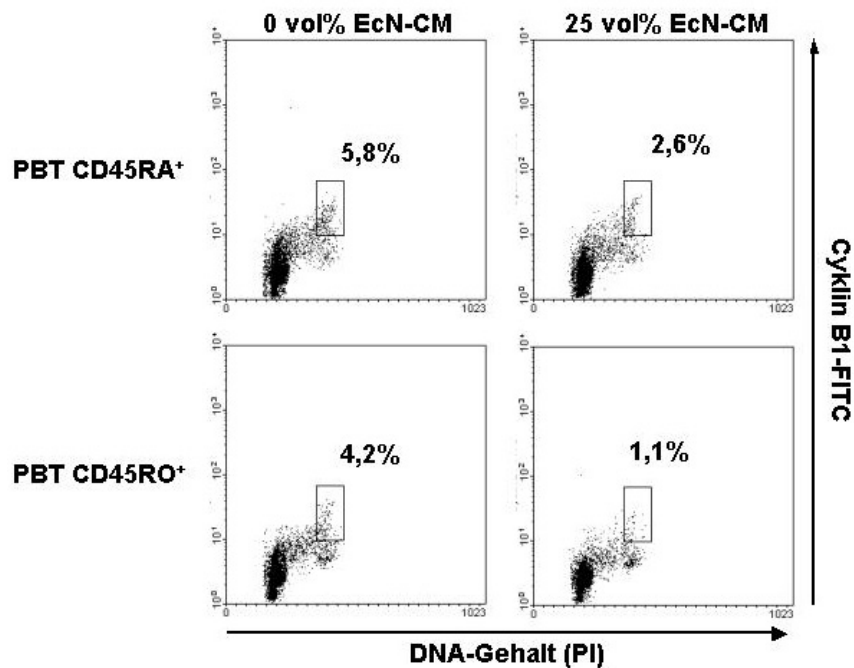


**Abb. 11:** CD3-stimulierte LPT expandieren unter Zugabe von EcN-CM ungehindert. Durch CFDA-Färbung wurde die Zellexpansion von LPT sichtbar gemacht und dabei kein Einfluss von EcN-CM beobachtet.

### 3.5.4 Zellzyklus von CD45RO- und CD45RA positiven PBT

Nachdem Lamina propria T-Zellen im Gegensatz zu peripheren T-Zellen keine Beeinflussbarkeit ihrer Zellzyklusprogression und Expansion durch EcN-Kulturüberstände zeigten, wurde untersucht, ob dieser Unterschied auf dem unterschiedlichen Memorystatus der Zellpopulationen beruht.

Als Unterscheidungsmerkmal zwischen naiven und Memoryzellen diene die Expression des Oberflächenmoleküls CD45, das in seiner Unterform CD45-RA auf naiven T-Zellen exprimiert wird, während Memoryzellen das Antigen CD45-RO tragen. Die anhand dieses Merkmals magnetisch separierten PBT wurden jeweils für 72h mit CD3-Antikörpern stimuliert und in Ab- oder Anwesenheit von 25% EcN-CM kultiviert. Die Zellzyklusprogression wurde danach mittels Messung der Cyclin B1-Expression und des DNA-Gehaltes bestimmt.



**Abb. 12:** Cyclin B1-Expression getrennt für CD45-RA positive (naive) T-Zellen und CD45-RO positive (Memory-) T-Zellen. Sowohl Memory- als auch naive T-Zellen werden durch 25%igen Zusatz von EcN-CM in ihrer Progression zur G2/M-Phase gehemmt.

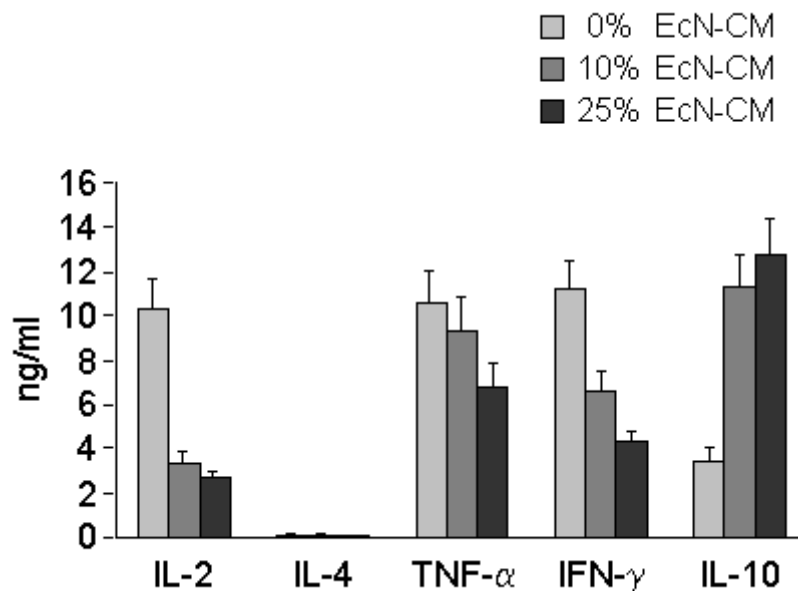
CD45-RO positive periphere T-Zellen zeigten dabei ein ähnliches Verhalten gegenüber EcN-CM wie die CD45-RA positive Population. In den Subpopulationen ließ sich durch Stimulation ihres T-Zell Rezeptors ein Anteil von 4,2% bzw. 5,8% zum Durchlaufen des Zellzyklus zur G2/M-Phase anregen. Zugabe von 25% EcN-CM verringerte diesen Anteil auf 2,1% bzw 1,1%.

Somit kann die distinkte Zellzyklusbeeinflussung von PBT und LPT durch EcN-CM nicht durch deren mehrheitlichen Memorystatus erklärt werden sondern deutet auf eine besondere Eigenschaft der gewebeständigen LPT hin.

### **3.6 Modulation der Zytokinsekretion durch EcN**

Zytokine sind essentielle Botenstoffe der Wirtsabwehr und des interzellulären *Crosstalks*. Zellen des Immunsystems und anderer Abstammung kommunizieren über die Sekretion von Zytokinen und steuern darüber Vorgänge wie Differenzierung, Proliferation und Apoptose. In dem Geflecht von Zytokinen und ihren Rezeptoren gibt es pro- und antiinflammatorische Mediatoren, die sich in ihrer Expression in verschiedenen Zellpopulationen unterscheiden.

Daher wurde die Sekretion von Zytokinen durch PBT in Gegenwart von EcN-CM mit einem *Cytometric Bead Array* gemessen. Die Zellen wurden für 72h in 0, 10 oder 25%igen Konzentrationen von EcN-CM kultiviert und dann durch Zentrifugieren ein Zellkulturüberstand gewonnen, in dem die Konzentrationen der entsprechenden Zytokine gemessen wurden.



**Abb. 13: Modulation der Zytokinsekretion von CD3-stimulierten PBT durch EcN.** PBT wurden für 72h in den genannten Konzentrationen von EcN-CM kultiviert und danach die Konzentrationen der Zytokine im Zellkulturmedium mit dem *Cytometric Bead Array* gemessen.

Wir konnten zeigen, dass EcN-CM eine Herabregulation der Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-2, TNF-α und IFN-γ in stimulierten PBT bewirkt. Im Gegensatz dazu wurde das antiinflammatorische Zytokin IL-10 durch EcN-CM heraufreguliert. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich keine Beeinflussung der IL-4 Sekretion von PBT durch EcN-CM. IL-4 ist ein Zytokin mit komplexer Wirkung, das durch mononukleäre Zellen aus der Lamina propria von Patienten mit CED vermindert exprimiert wird [95].

### **3.7 Wirkung von nicht probiotischen *E. coli* Stämmen und Bakterienbestandteilen auf den Zellzyklus von peripheren T-Zellen.**

Es wurden Versuche unternommen, die Spezifität der beschriebenen Effekte von *E. coli* Nissle 1917 auf periphere T-Lymphozyten zu bestimmen sowie erste Erkenntnisse über das wirksame Agens zu gewinnen.

#### **3.7.1 Wirkung von anderen *E. coli* Stämmen auf PBT**

Analog zu den zuvor durchgeführten Versuchen wurden bakterielle Kulturüberstände von anderen *E. coli* Stämmen gewonnen und deren Auswirkung auf die Zellzyklusprogression von CD3-stimulierten PBT gemessen. Dafür standen die apathogenen Stämme PZ 830, PZ 831, PZ 840, PZ 970 und DSM 498 zur Verfügung. Die konditionierten Medien wurden in 25%iger Konzentration dem Kulturmedium zugegeben. Nach 72h Inkubation wurde die Cyklin B1-Expression gemessen und mit der Expression von ohne Bakterienmedium stimulierten PBT verglichen.

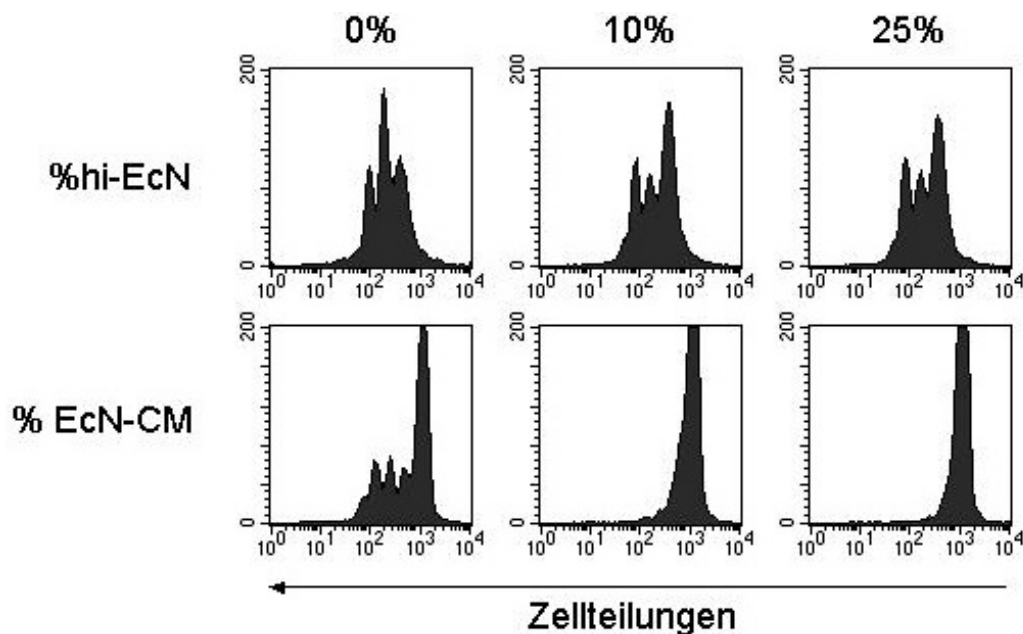
Für jeden der untersuchten Stämme ließ sich eine dem EcN entsprechende Zellzyklusmodulation von PBT nachweisen. Der bakterielle Kulturüberstand apathogener *E. coli* Stämme konnte in 25%iger Verdünnung die Expression von Cyklin B1 in der G2/M-Phase um 20,6 – 68,4% reduzieren und demnach das Durchlaufen des Zellzyklus zur G2/M-Phase verhindern. Die beschriebene Inhibierung des PBT Zellzyklus durch EcN ist demnach nicht für diesen Stamm spezifisch.

#### **3.7.2 Wirkung von inaktivierten Bakterien auf PBT**

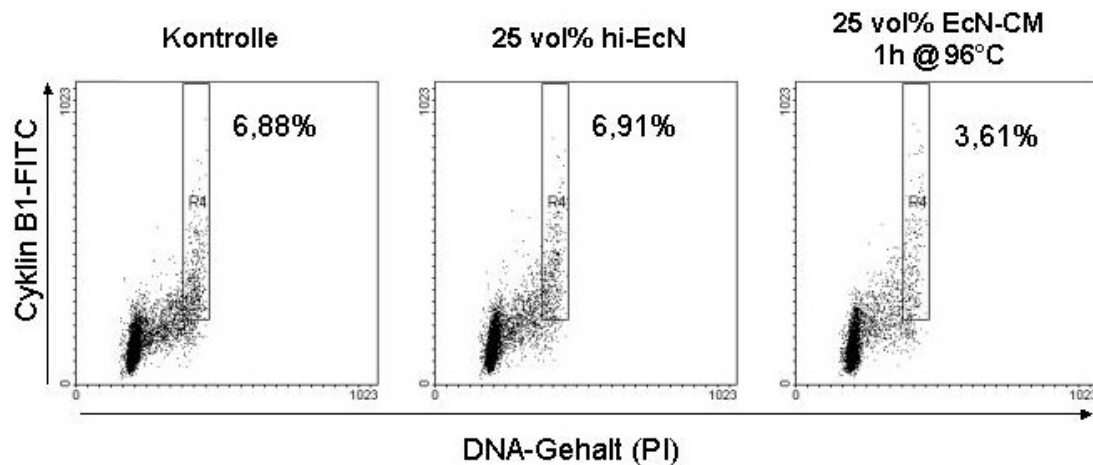
In den vorhergehenden Versuchen wurde ein inhibitorischer Effekt bakterieller Kulturüberstände von *E. coli* Nissle 1917 auf die Zellzyklusprogression und Expansion von peripheren T-Lymphozyten gezeigt. Bakterielle Kulturüberstände enthalten eine Vielzahl von Stoffen, die entweder von den Bakterien sezerniert wurden oder aus zugrunde gegangenen Bakterien entstammen können und als wirksamer Faktor in Frage kommen. Insbesondere die Zellwände von Bakterien enthalten Verbindungen, deren immunmodulatorisches Potential bekannt ist.

Um Erkenntnisse über den wirksamen Faktor in den beschriebenen Versuchen zu gewinnen, wurden diese zunächst mit hitzeinaktivierten EcN (hi-EcN) an Stelle von Kulturüberständen wiederholt. EcN wurden für eine Stunde bei 96°C inaktiviert. PBT wurden über 72h durch CD3-Antikörper stimuliert und in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der inaktivierten Bakterien kultiviert. Als Ausleseparameter wurde die Cyclin B1-Expression und die Expansion gemessen (s. Abb. 14 und 15).

Dabei zeigte sich, dass der inhibitorische Effekt von EcN-CM nicht durch hitzeinaktivierte Bakterien reproduzierbar ist. Auch unter Zugabe großer Mengen inaktivierter Bakterien konnten PBT ungehindert den Zellzyklus durchlaufen und expandieren.



**Abb. 14:** Expansion von CD3-stimulierten PBT unter Zugabe hi-EcN (unten im Vergleich dazu die Wirkung von EcN-CM). Die Konzentration der hitzeinaktivierten Bakterien entspricht der Bakterienkonzentration eines entsprechenden konditionierten Mediums vor der Sterilfiltration.



**Abb. 15: Cyclin B1-Expression von CD3-stimulierten PBT.** Links (Kontrolle) ohne Zugabe von Bakterienmedium, in der Mitte unter Zugabe von hitzeinaktivierten EcN, rechts mit einem EcN-CM, welches vorher für eine Stunde auf 96°C erhitzt worden war. Hitzeinaktivierte EcN hemmen die Cyclin B1-Expression der Zellen nicht, der zellzyklusprogressionshemmende Effekt von EcN-CM ist dagegen hitzestabil.

Nachdem gezeigt wurde, dass hitzeinaktivierte Bakterien keinen hemmenden Effekt auf die Zellzyklusprogression und Expansion von PBT haben, sollte untersucht werden, ob EcN-CM durch eine vergleichbare Hitzebehandlung ebenfalls unwirksam würde. Deshalb wurden Versuche unternommen, die Wirkung eines EcN-CM durch Erhitzen auf 96°C für eine Stunde zu inaktivieren. Anschließende Messungen der Cyclin B1-Expression von PBT ergaben, dass das so behandelte Medium weiterhin die Zellzyklusprogression von PBT hemmte (Abb. 15).

Bakterielle Kulturüberstände, nicht aber die hitzeinaktivierten Bakterien selber inhibieren die Zellzyklusprogression und Expansion von stimulierten PBT. Die wirksamen Faktoren im EcN-CM sind hitzestabil.



## 4 DISKUSSION

### 4.1 Immunmodulation durch EcN und andere Probiotika

Die Ergebnisse der im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit durchgeführten Versuche zeigen neuartige immunmodulatorische Effekte des E. coli Nissle 1917. Diese können als Hinweis auf einen Mechanismus der therapeutischen Wirksamkeit des Keims bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen dienen.

Der zügige Eintritt und die Progression von T-Zellen in den Zellzyklus mit konsekutiver Zellteilung und Expansion der Zellpopulation ist die Voraussetzung einer effektiven Immunantwort des Wirtsorganismus [96]. Dagegen führt eine unkontrolliert überschießende Zellexpansion je nach Kontext zu Malignität, Autoimmunität oder mangelnder Toleranz gegenüber oralen Antigenen [97].

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass Kulturüberstände von E. coli Nissle 1917 den Zellzykluseintritt und die Progression von CD3-aktivierten peripheren T-Zellen *in-vitro* hemmt. Eine vergleichbare Wirkung *in-vivo* vorausgesetzt würde E. coli Nissle demnach zu einer verminderten Immunantwort nach Antigenkontakt führen und dadurch die bei CED vorliegende gesteigerte Immunreaktion auf luminale Antigene inhibieren [97]. Die durchgeführten Versuche bieten so einen Ansatz zum Verständnis der klinischen Wirksamkeit von EcN-Präparationen bei Patienten mit CED, Erkrankungen, bei denen gezeigt wurde, dass der Verlust der oralen Toleranz in der Pathogenese eine zentrale Rolle spielt [84].

Dass Probiotika, speziell E. coli Nissle 1917, vielfältige immunmodulatorische Wirkungen besitzen, wurde aufgrund von klinischen Studien unterlegt und ist mittlerweile auch durch *in-vitro* Studien gut dokumentiert:

- Lebende E. coli Nissle inhibierten die Invasion von invasiven Bakterienstämmen (Salmonellen, Yersinien, Listerien u.a) in enterozytenähnliche Zellen. Die Fähigkeit, in Enterozyten einzudringen, ist ein wichtiges Pathogenitätsmerkmal dieser Bakterienstämme. Dieser Effekt wird nicht durch das EcN-Mikrozin oder eines seiner Adhäsine, sondern durch bisher unbekannte Faktoren bedingt [98].
- EcN vermindert bei oraler Gabe die Sekretion proinflammatorischer Zytokine in mesenterischen Lymphknoten verschiedener Mausmodelle und verbessert den histologischen Befund im chronischen Colitismodell [99].

- EcN inhibiert *in-vitro* die Adhäsion und Invasion von pathogenen E. coli-Stämmen an Epithelzellen. Dieser Effekt ist sowohl bei Koinfektion als auch und um so stärker bei Präinkubation mit dem EcN zu beobachten. Als Erklärung wird die starke Adhäsion des EcN genannt, die zur Bildung eines Biofilmes führen könnte, der wiederum die für die Invasion nötigen Rezeptoren maskiert und so die intestinalen Zellen schützt (Kompetition) [9].
- EcN, nicht aber andere E. coli Stämme, induzierten die Expression von humanem Beta-Defensin 2 in CaCo-Zellen. Defensine bilden eine Gruppe von kleinen antimikrobiellen Peptiden, die durch intestinale Epithelzellen sezerniert werden und die Barrierefunktion der Mukosa stärken [100].
- Eine Besiedelung des Darmes mit E. coli Nissle 1917 schützte Mäuse vor einer intravenösen Infektion mit *Listeria monocytogenes* oder *Candida albicans*. In den Zielorganen der entsprechenden Parasiten wurden im Vergleich zu Kontrolltieren weniger lebensfähige Organismen gefunden [101].

Obwohl die Vermutung nahe liegt, dass bakterielle Produkte jeglicher Art physiologischer Weise eher zu einer Stimulation des Immunsystems führen müssten, ist auch für andere Bakterienstämme ein antientzündlicher Effekt beschrieben worden:

- Die von Neish *et al.* [80] veröffentlichten Ergebnisse lieferten deutliche Evidenz dafür, dass nichtvirulente *Salmonella*-Stämme die Degradation von I $\kappa$ B hemmen. I $\kappa$ B bindet und antagonisiert den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der für die Aktivierung vielfältiger Entzündungsgene verantwortlich zeichnet [102]. Dies ist ein starker Hinweis auf den Mechanismus, durch den nichtvirulente Bakterien einen therapeutischen Effekt bei CED ausüben [75].
- In einer weiteren Studie wurden die Auswirkungen von Cytoplasmaextrakten grampositiver probiotischer Stämme auf die Proliferation von mononukleären Zellen untersucht [103]. Vergleichbar mit den hier vorgestellten Ergebnissen hemmten die bakteriellen Produkte die Proliferation der Zellen und der wirksame Faktor war hitzestabil. Extrakte aus der Zellwand der Bakterien waren dagegen wirkungslos. Eine genauere Charakterisierung des wirksamen Faktors wurde in dieser Studie nicht vorgenommen.

Es ist jedoch zu vermuten, dass sich diese Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf gramnegative Probiotika wie EcN übertragen lassen, da es Hinweise auf

unterschiedliche Wirkungen der verschiedenen probiotischen Bakterienspezies gibt. E. coli Nissle 1917 induzierte im Gegensatz zu grampositiven probiotischen Bakterienstämmen die Produktion von Interleukin (IL)-8 durch HT-29 [104] und IEC-6 [72] Zellen *in-vitro*. Das Zytokin IL-8 ist ein Mitglied der CXC-Chemokinfamilie und hat chemotaktische und leukozytenstimulierende Wirkung. Außerdem konnte lediglich für EcN eine Induktion der IL-10 Sekretion nachgewiesen werden, grampositive Stämme zeigten diese Wirkung nicht [105]. Dies kann als Hinweis auf die Aktivierung unterschiedlicher Signalwege durch grampositive und gramnegative Probiotika gewertet werden.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde erstmalig ein direkter hemmender Effekt von E. coli Nissle 1917 auf humane periphere T-Zellen nachgewiesen. T-Zellen werden als Effektorzellen des Entzündungsgeschehens für CED verantwortlich gemacht. In den Versuchen kamen PBT ohne kostimulatorische Zellen zum Einsatz, es befanden sich also annähernd keine Antigenpräsentierenden oder sonstigen immunregulatorischen Zellen unter den T-Zellen. Antigenpräsentierende Zellen (APC) sind für die Aktivierung der Mehrzahl von peripheren T-Zellen notwendig, jedoch gibt es T-Zell-Subpopulationen, die durch bakterielle Peptide direkt stimulierbar sind, ohne dass diese auf dem *Major Histocompatibility Complex* von APCs präsentiert werden müssten [106]. Die ursprüngliche Auffassung, dass T-Zellen reine Effektorzellen sind und für ihre Aktivierung auf andere Zellpopulationen angewiesen sind, kann durch die Entdeckung von *Toll-like*- und *Leukocyte-Pattern-Recognition*-Rezeptoren auf diesen nicht mehr aufrecht erhalten werden [107]. Eine direkte Beeinflussung der Zellzyklusprogression von peripheren T-Zellen durch bakterielle Produkte, wie sie in der vorliegenden Studie beobachtet wurde, ist damit keineswegs unwahrscheinlich, die beteiligten Rezeptoren bleiben aber spekulativ.

## **4.2 Regulation von Zellzyklusmediatoren durch EcN**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass EcN die Zellzyklusprogression von PBT hemmt, sollten die bei der Regulation beteiligten molekularen Mechanismen identifiziert werden.

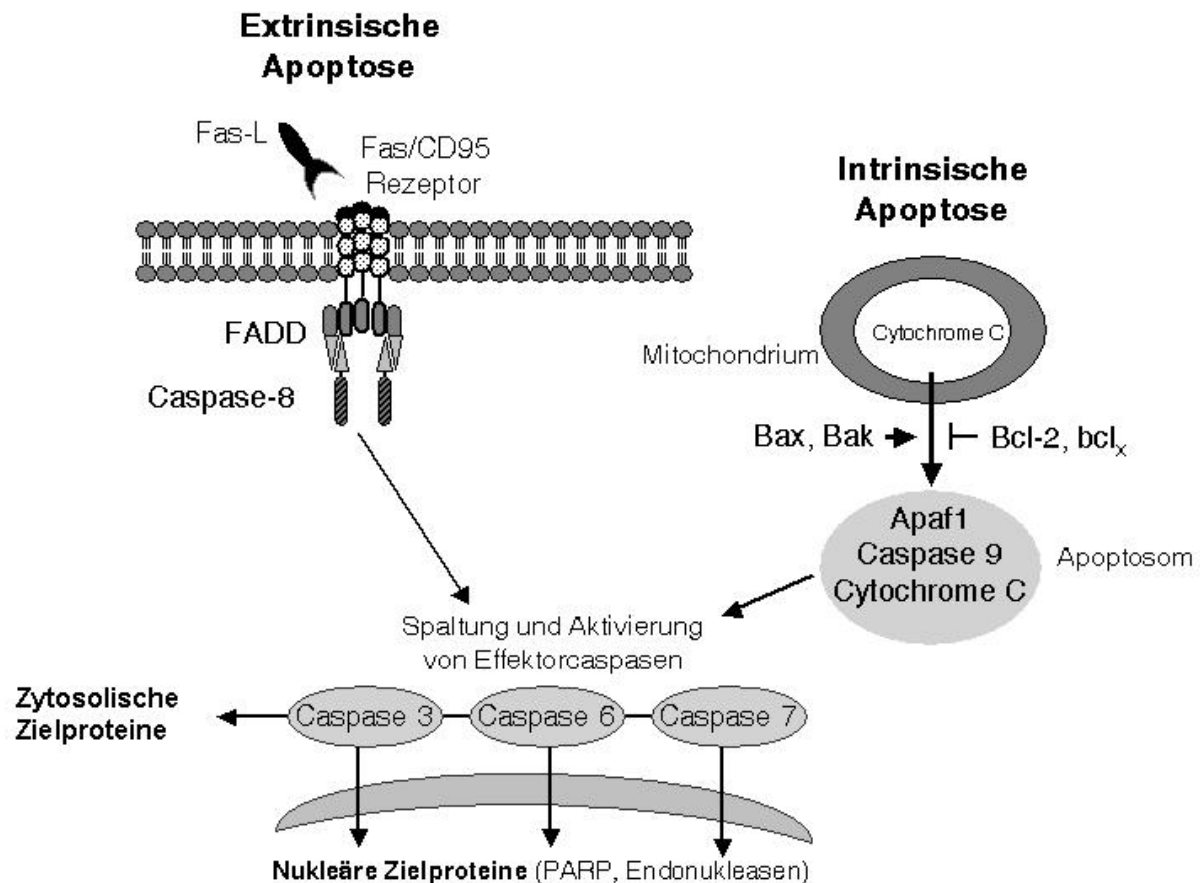
Als ursächlich für diese Hemmung der Zellteilung konnte eine Herabregulation von Cyklinen in allen Phasen des Zellzyklus identifiziert werden. Cyklin D2 ist ein in T-Zellen der G1-Phase exprimiertes Cyklin, das die Phosphorylierung des

Retinoblastomaproteins bewirkt und darüber zur Aktivierung von E2F-Genprodukten führt. Diese führen zum Passieren des so genannten G1/S-Restriktionspunkts, einem „Punkt ohne Wiederkehr“, von dem an die Zelle den Zellzyklus unabhängig vom ursprünglichen mitogenen Stimulus durchläuft. Die verminderte Expression von Cyklin D2 in Gegenwart von EcN-CM zeigt, dass der für die Wirkung des bakteriellen Kulturüberstandes verantwortliche Regulationsschritt schon früh im Zellzyklus auftritt. Eine Hemmung des G1/S-Übertrittes, wie sie unter EcN-CM beobachtet wurde, reicht somit aus um die verminderte Expression von Cyklin A, E und B1 in späteren Zellzyklusphasen zu erklären. Letztlich führt sie dazu, dass die Zellen langsamer die S-Phase durchlaufen, mehr Zeit pro Zellteilung benötigen und die stimulierte Zellpopulation langsamer expandiert.

Die Hemmung der Zellzyklusprogression von peripheren T-Zellen durch Kulturüberstände von EcN hätte auch durch eine Induktion der ubiquitären Zellzyklusinhibitoren p21 und p53 bewirkt werden können. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass EcN-CM keine erhöhte Expression dieser Proteine bewirkt, so dass die endogenen Inhibitoren vermutlich nicht an der Wirkung von EcN-CM beteiligt sind.

#### ***4.3 Beeinflussung der Apoptoserate bei CED***

Der programmierte Zelltod ist ein in der Evolution hoch konservierter Prozess, der in der Entwicklung, Reifung und Alterung mehrzelliger Lebewesen eine Schlüsselrolle spielt. Über 99,9% der Zellen, die im Laufe des Lebens eines Menschen entstehen, sterben durch Apoptose [108]. Sie ist z.B. involviert in der Bildung der Interdigitalspalten während der Embryogenese, der Involution der Brustdrüsen und der Entwicklung von Hohlorganen. Die Fähigkeit, überschüssig produzierte Zellen durch Apoptose zu reduzieren, gewährleistet die Homöostase der Zellzahl in Wechselgeweben und dem hämatopoetischen System und ist für den Organismus überlebenswichtig. Auf der anderen Seite ist der Verlust der Fähigkeit zur Apoptose ein Merkmal von vielen Autoimmun- und malignen Erkrankungen [108].



**Abb. 16: Regulation von extrinsischen und intrinsischen Apoptosewegen.**

Apoptose kann auf verschiedenen Wegen eingeleitet werden und führt zu einer Kernschrumpfung, zur Spaltung der DNA in Bruchstücke von ca. 200bp und schließlich zum Zerfall der Zelle in so genannte *apoptotic bodies*, die phagozytiert werden [109]. Für die Induktion und Exekution der Apoptose ist die Auslösung einer Enzymkaskade verantwortlich, die in der proteolytischen Aktivierung der Cystein-Aspartase Caspase 3 mündet. Während Caspase 3 der Effektor ist und durch vorgeschaltete Caspasen aktiviert wird, stehen Caspase 8 und 9 am Anfang der Kaskade. Caspase 8 wird durch den Fas-Rezeptor in seine aktive Form überführt und leitet so eine Apoptose als Reaktion auf äußere Signale ein (extrinsischer Apoptoseweg). Caspase 9 wird dagegen unter Mitwirkung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert. Das Freiwerden von Cytochrom C aus den Mitochondrien kann eine Reaktion auf DNA-Schädigung oder andere intrazelluläre Signale (intrinsischer Apoptoseweg), oder ebenfalls durch Rezeptor-Ligandenbindung bewirkt sein [110]. Das komplizierte Netzwerk der Caspasen wird durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine ergänzt, die die Aktivierung von Caspasen hemmen. So ist

mit FLIP ein Enzym bekannt, das in seiner aktivierten Form die Spaltung von Caspase 8 und damit die Aktivierung des extrinsischen Apoptoseweges hemmen kann. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie haben teils pro- und teils antiapoptotische Wirkung. Während Bcl-2 selber das Freiwerden von Cytochrom C aus den Mitochondrien hemmt, ist Bax ein proapoptotischer Vertreter dieser Gruppe.

T-Lymphozyten in der G0-Phase des Zellzyklus, also solche, die in einem Ruhezustand sind, sind unempfindlich gegenüber proapoptotischen Signalen. Dagegen steigt ihre Bereitschaft zum programmierten Zelltod wenn sie durch Antigenkontakt stimuliert werden und proliferieren. Dieser antigeninduzierte Zelltod (AICD) trägt dazu bei, die Zellzahl auch im Falle einer kontinuierlichen oder wiederholten Aktivierung des Immunsystemes relativ stabil zu halten [111].

In T-Lymphozyten von Patienten mit CED scheint eine Reihe von Apoptosemechanismen fehlerhaft abzulaufen, welche die Mitwirkung von Mitochondrien voraussetzen. In der Folge ist die Fähigkeit von T-Lymphozyten zur antigeninduzierten Apoptose bei diesen Erkrankungen eingeschränkt [83]. Dem entspricht die klinische Wirksamkeit des TNF- $\alpha$  Antikörpers Infliximab bei Morbus Crohn [112]: TNF- $\alpha$  ist ein starkes, im Wesentlichen durch Lymphozyten und Makrophagen produziertes proentzündliches Zytokin, das im Serum und im Stuhl von Morbus Crohn-Patienten verstärkt nachgewiesen werden kann. Infliximab bindet und neutralisiert nicht nur gelöstes TNF- $\alpha$  sondern auch solches, das von Lymphozyten auf der Zellmembran exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass es in diesen Zelllinien eine Apoptose bewirkt, indem es das Bax/Bcl-2 Verhältnis zugunsten der proapoptotischen Bcl-2 Familienmitglieder verschiebt. In der Folge wird vermehrt Cytochrom C aus den Mitochondrien freigesetzt und die Kaskade der Caspasen aktiviert, die zur Apoptose von Lamina propria T-Lymphozyten führt [113, 114].

Die Möglichkeit der Induktion von Apoptose durch ein Probiotikum ist bekannt. Es wurde gezeigt, dass Propionibakterien durch Sekretion der kurzkettigen Fettsäuren Acetat und Propionat in Darmkrebszellen typische Zeichen von Apoptose hervorrufen können [112].

Im Wissen um die Rolle der Apoptose von T-Zellen in der Pathogenese von CED konnte vermutet werden, dass EcN die Apoptoserate dieser Zellpopulation erhöht und auf diese Weise den Fortschritt des Entzündungsgeschehens bremst. Diese Vermutung konnte in den durchgeführten Versuchen jedoch nicht bestätigt werden.

Es wurde weder eine erhöhte Apoptoserate noch veränderte Expressionen der am Cytochrom C-abhängigen Apoptoseweg beteiligten Proteine gemessen. Auch die Regulationsproteine des Fas-abhängigen, extrinsischen Apoptosewegs ließen sich durch Kultur mit EcN-CM nicht modulieren.

Der systemische und darüber hinaus irreversible Effekt von Infliximab birgt in der Praxis Risiken: Neben opportunistischen oder reaktivierten Infektionen [115, 116, 116] stellen seltene Pan- und Monozytopenien mögliche Nebenwirkungen dar [113, 117, 118]. EcN beeinflusste dagegen nicht die Apoptoserate von PBT, sondern selektiv deren Zellzyklusprogression. Außerdem konnte durch zusätzliche in der Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche (die Teil einer weiteren Promotionsarbeit sind) gezeigt werden, dass die T-Zellfunktion vollständig wieder hergestellt werden konnte, nachdem das Bakterienmedium entzogen wurde. Der Effekt auf die T-Zellen ist also im Gegensatz zu dem von Infliximab reversibel. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass EcN ähnlich den TNF- $\alpha$ -Antagonisten zwar über eine Beeinflussung des Gleichgewichtes zwischen Zellexpansion und Apoptose der T-Zellen wirkt, ohne jedoch die Apoptoserate direkt zu erhöhen und so die genannten Risiken der TNF- $\alpha$ -Antagonisten hervorzurufen.

#### ***4.4 Distinkte Zellzyklusregulation durch EcN in PBT und LPT***

Lamina propria T-Zellen (LPT) des Darmes stellen eine Zellpopulation dar, die mit ihrer fein regulierten Balance von Expansion und Apoptose entscheidend zur Homöostase des intestinalen Immunsystems beiträgt. Ihre besondere Verantwortung liegt in der Wahrung der Toleranz gegenüber der physiologischen Darmflora. Fehlregulationen der Immunantwort dieser Zelllinie gelten als ursächlich für die Initiierung und Fortführung der chronischen Entzündung bei CED [84].

Vielfältige Befunde haben gezeigt, dass die Lymphozyten des Darmtraktes einmalige Eigenschaften besitzen [119]. Diese Zellen haben in den Peyer'schen Plaques mehrheitlich bereits Antigenkontakt gehabt und sind anschließend über die systemische Zirkulation in die Mukosa ausgewandert. Es handelt sich damit zum weit überwiegenden Teil um Memory T-Zellen; in der Expression von Oberflächenantigenen unterscheiden sich diese allerdings in mancher Hinsicht von Memoryzellen aus dem peripheren Blut [119]. Dabei handelt es sich offensichtlich zum Teil um Moleküle mit denen LPT mit anderen Zellen der Mukosa interagieren. Im

Vergleich zu PBT scheinen LPT verstärkt regulatorische Funktion zu besitzen und obwohl sie zu einem höheren Anteil in aktiviertem Zustand vorliegen, proliferieren sie langsamer nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors. LPT exprimieren außerdem zu einem hohen Anteil den Fas-Liganden und zeigen eine erhöhte Bereitschaft zum antigeninduzierten Zelltod [119].

Um der herausragenden Rolle der LPT gerecht zu werden wurde der Effekt von EcN-CM auf die Zellzyklusprogression und Expansion von LPT untersucht. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse fällt zunächst auf, dass LPT im Vergleich zu den peripheren T-Zellen trotz maximaler Stimulation (sowohl über der CD3- als auch über den CD2-Rezeptor) weniger Cyklin B1 exprimieren sowie eine kleinere Fraktion den Zellzyklus durchläuft. Schließlich findet in der selben Zeit, in der die peripheren Zellen vier Tochtergenerationen hervorbringen, in der LPT-Kultur unter ansonsten gleichen Bedingungen durchschnittlich lediglich eine Verdopplung statt. Diese Ergebnisse decken sich mit früheren Beobachtungen [85], und der Erfahrung, dass LPT eine ruhende Zellpopulation mit überwiegend Memory-Status darstellen [120].

Während PBT durch EcN-CM an ihrer Zellzyklusprogression und Expansion gehindert wurden, ließ sich ein vergleichbarer Effekt bei LPT nicht feststellen. Dieser Unterschied könnte einerseits auf den oben genannten grundlegenden Unterschieden zwischen PBT und den stärker differenzierten und determinierten LPT, andererseits aber auch auf dem Memoryzellstatus von Lamina propria T-Zellen beruhen. Während periphere T-Zellen nur zu 30-50% Memoryzellen sind, stellen LPT eine Zellpopulation dar, die mehrheitlich bereits Antigenkontakt hatte und viele Eigenschaften von Memoryzellen teilt.

Um der Frage nachzugehen, ob der Memorystatus von LPT für deren fehlende Hemmbarkeit durch EcN verantwortlich ist, wurde die Fraktion der Memoryzellen aus PBT isoliert und in ihrem Zellzyklusverhalten mit naiven peripheren T-Zellen und LPT verglichen. Memory T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche das Antigen CD45RO, während naive T-Zellen CD45RA-positiv sind [119]. Daher kann man die Zellen anhand gegen diese Antigene gerichtete Antikörper unterscheiden und sortieren. Die Tatsache, dass EcN-CM CD45RA- und CD45RO-positive periphere T-Zellen in vergleichbarer Weise inhibierte, deutet darauf hin, dass für die mangelnde Wirkung bei LPT nicht etwa der Memory-Status, sondern deren mukosale Herkunft oder Differenzierung verantwortlich ist. Es muss von grundlegenden Unterschieden



zwischen den beiden Zellpopulationen ausgegangen werden, die zum Beispiel durch die mukosale Mikroumgebung mitsamt den besonderen Zell-Zell-Interaktionen oder einen anderen Aktivierungsstatus bedingt sein könnten [121]. Hier ergeben sich Ansätze zu weiterer Forschung.

Die fehlende Beeinflussung von LPT macht es denkbar, dass EcN die mukosale Immunreaktion unbeeinflusst lässt und so die Gefahren, die von einer Unterdrückung der lokalen Immunantwort verbunden sind, umgeht. Dagegen könnte EcN spezifisch die peripheren T-Zellen hemmen, die im Zuge der chronischen Entzündung bei CED aus dem Blutpool rekrutiert werden [122]. Dies könnte einerseits bei direktem Kontakt von Bakterien mit Lymphozyten in den Peyer'schen Plaques geschehen, in die Colibakterien bei CED verstärkt translozieren [123].

Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass systemische immunmodulatorische Wirkungen von Probiotika nach oraler Verabreichung aus anderen Studien bekannt sind. Für drei probiotische Laktobazillenstämme konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass sie nach oraler Gabe die Proliferation von zirkulierenden Lymphozyten inhibierten [124]. Diese Beobachtungen zeigen die Möglichkeit einer systemischen Immunmodulation durch Probiotika nach oraler Gabe.

#### ***4.5 Modulation der Zytokinsekretion durch EcN***

Eine Entzündungsreaktion erfordert die Aktivierung von verschiedenen immunkompetenten Zellpopulationen, die Zytokine ausschütten und so weitere Zellen rekrutieren. Zytokine beeinflussen auch die Proliferation und Differenzierung von Effektorzellen und den Ablauf der Immunreaktion.

IL-2 ist ein Zytokin das von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung sezerniert wird und die Proliferation und Differenzierung von T-, B-, und Natural Killer-Lymphozyten stimuliert [125]. Die Interaktion von IL-2 mit dem korrespondierenden Rezeptor ist Voraussetzung für die Proliferation, Differenzierung und Effektorfunktion von T-Zellen [119]. Übereinstimmend mit der Herabregulation der Proliferation aktivierter peripherer T-Zellen hemmte EcN-CM die Sekretion von IL-2 durch diese Zellen. TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  sind zwei weitere potente proinflammatorische Zytokine, die darüber hinaus wahrscheinlich eine Rolle in der Pathogenese von CED spielen [3, 126]. Indem gezeigt werden konnte, dass EcN-CM die Sekretion dieser beiden

Zytokine durch PBT hemmt, deutete sich ein antiinflammatorischer Effekt der bakteriellen Produkte an, der über die reine Beeinflussung des Zellzyklus hinaus auch die humorale Komponente der Wirtsabwehr umfasst.

Im Gegensatz zu der Herabregulation dieser proinflammatorischen Zytokine konnte unter dem Einfluss von EcN-CM ein Anstieg in der Sekretion von IL-10 durch aktivierte PBT gemessen werden, einem Zytokin mit sowohl antiinflammatorischen [127, 128] als auch proinflammatorischen [129, 130] Effekten. Es wird von verschiedenen immunkompetenten Zelllinien, aber auch Keratinozyten sezerniert und sein Rezeptor wird von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert. Lang andauernde, hoch dosierte Antigenstimulation in Gegenwart von IL-10 induziert die Differenzierung einer regulatorischen T-Zell Subpopulation ( $T_{R1}$ ), welche die Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen hemmt [79]. Dies könnte ein mögliches Modell zur Erklärung der oralen Toleranz sein, denn IL-10 defiziente Mäuse entwickeln nach der Etablierung einer Darmflora eine mukosale, Morbus Crohn-ähnliche Entzündung [131]. Der hemmende Effekt, den IL-10 auf die Proliferation von aktivierten T-Zellen ausübt, hat dazu geführt, dass man es therapeutisch bei Patienten mit CED eingesetzt hat [132, 133], wenn es auch in der Praxis Schwierigkeiten mit der lokalen Applikation gibt. Dass EcN-CM die Sekretion von IL-10 durch aktivierte PBT induziert, könnte deshalb von unmittelbarer Bedeutung für dessen immunmodulierenden Effekt sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass EcN-CM neben der Zellzyklusregulation auch auf die humorale Komponente der Immunreaktion wirkt, indem es das auf das Gleichgewicht von wichtigen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen beeinflusst.

#### **4.6 Wirksame Faktoren in bakteriellen Kulturüberständen**

Bakterielle Kulturüberstände von EcN bewirken eine substanzielle Modulation von Zellzykluskinetik, Zellexpansion und Zytokinsekretion von peripheren T-Zellen, welche die klinische Wirksamkeit von EcN als Probiotikum erklären könnten. Durch die besondere Zubereitung des EcN-CM sollte der Effekt bakterieller Sekretionsprodukte auf T-Zellen untersucht werden, während die Auswirkungen bakterieller Kontamination der Zellkultur vermieden werden mussten. Um die Menge der möglichen bakteriellen Produkte einzugrenzen, wurden anstatt des

Kulturüberstandes hitzeinaktivierte *E. coli* verwendet und es wurde versucht, den bakteriellen Kulturüberstand durch Hitze oder Kälte zu inaktivieren.

Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der immunmodulatorische Effekt des bakteriellen Kulturüberstandes durch hitzeinaktivierte Bakterien nicht reproduzieren ließ. Hingegen überstand die Wirksamkeit von EcN-CM eine einstündige Erhitzung auf 96°C sowie ein vorübergehendes Einfrieren. Dadurch können Peptide oder andere hitzelabile Moleküle als wirksames Bakterienprodukt ausgeschlossen werden [103]. In Frage kommen dagegen kleine stabilere bakterielle Produkte wie etwa Lipide, Phospholipide oder Nukleotide. Ein Teil dieser Moleküle, für die immunmodulatorische Effekte seit langem bekannt sind, wird als sog. PAMPs (pathogen associated molecular patterns) zusammengefasst. Zu den PAMPs, für die es jeweils Rezeptoren und Signalwege in Zellen des unspezifischen Immunsystems gibt, welche dem Wirt eine Infektion mit bakteriellen Erregern anzeigen, gehören Lipopolysaccharide (LPS), bakterielle Lipoproteine (BLP) und bakterielle DNA-Abschnitte (sogenannte CPG-Motive) sowie Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane [134]. Weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass BLP wie auch LPS in den bakteriellen Kulturüberständen in großen Mengen nachweisbar waren.

LPS (auch bekannt als Endotoxin) ist ein allgemeiner Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, besitzt aber im Fall von *E. coli* Nissle 1917 eine besondere Struktur, die für einige seiner Eigenschaften verantwortlich gemacht wird [68]. LPS wird jedoch eine eher immunstimulatorische Wirkung zugeschrieben, die noch dazu auf direkten Zellkontakt zu akzessorischen Zellen angewiesen zu sein scheint [135]. Um eine mögliche Beteiligung des Endotoxins an der beobachteten Wirkung des EcN-CM nachzuweisen, müssen Versuche mit aufgereinigtem EcN-LPS durchgeführt werden.

Eine weitere Stoffklasse bakteriellen Ursprunges mit immunmodulatorischen Eigenschaften sind CpGs. Dabei handelt es sich um unmethylierte Oligodesoxynukleotide, die über Rezeptoren von Zellen des Immunsystems erkannt werden [136]. Für die Wahrnehmung von CPGs scheint Toll-like Receptor 9 verantwortlich zu sein, der auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird [137]. CPGs werden zunächst immunstimulatorische Wirkungen zugeschrieben, allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass sie das Zytokinprofil zugunsten einer T<sub>H2</sub>-Immunantwort

modulieren [138]. Aktuelle Forschungsergebnisse haben darüber hinaus gezeigt, dass CpGs, die aus bestimmten, ebenfalls als Probiotikum bei CED erfolgreichen Laktobazillenstämmen isoliert wurden, in peripheren mononukleären Zellen zu einer Induktion der IL-10 Produktion führen [139]. Nachdem in den durchgeführten Versuchen mit EcN-CM ein vergleichbarer Effekt festgestellt werden konnte, wären CPGs als wirksamer Faktor denkbar.

Auch BLPs zählen zu den bakteriellen Motiven, die vom Immunsystem erkannt werden und wirken über einen Toll like Rezeptor 2-vermittelten Mechanismus adjuvant bei der Antigenreaktion von T-Zellen [140]. TLR-2 wird auf T-Zellen exprimiert, wenn auch nur auf der relativ kleinen Fraktion der  $\gamma\delta$ -T-Zellen [141]. Allerdings scheinen die bisher berichteten Wirkungen von BLPs lediglich auf eine Stimulation des Immunsystems hinzudeuten [140, 142], weshalb sich zunächst kein Anhalt für eine Beteiligung dieser Stoffklasse an der Wirksamkeit von EcN bei CED ergibt.

Die durchgeführten Untersuchungen konnten die zellzyklusinhibierende Wirkung von EcN eingrenzen auf ein lösliches hitzestabiles bakterielles Produkt. Die Zugehörigkeit zu einer der oben genannten Stoffgruppen mit bekannter immunmodulatorischer Wirksamkeit ist denkbar und Teil weiterer Untersuchungen der Arbeitsgruppe.

#### ***4.7 Spezifität des Immunmodulatorischen Effektes von EcN***

Nachdem die Zellzyklusmodulation von PBT durch EcN untersucht wurde, musste die Spezifität dieser Wirkung untersucht werden. Dafür wurden konditionierte Medien von fünf anderen, nonpathogenen und nicht-probiotischen E. coli Stämmen hergestellt und deren Einfluss auf die Zellzyklusprogression stimulierter PBT gemessen. Der aus diesen Stämmen gewonnene bakterielle Kulturüberstand hatte eine Wirkung auf stimulierte periphere T-Zellen, die mit der Wirkung des E. coli Nissle 1917 in Art und Umfang durchaus vergleichbar war; der beschriebene Effekt scheint also nicht für EcN spezifisch zu sein.

Da es sich bei den verwendeten Kontrollstämmen um Isolate aus dem Darm von sowohl gesunden Personen als auch Patienten mit Colitis ulcerosa bzw. Morbus Crohn handelt, reicht der zellzyklusmodulatorische Effekt nicht allein für die Erklärung der klinischen Wirksamkeit von EcN bei der Behandlung dieser Erkrankungen aus. Vielmehr muss angenommen werden, dass gerade die Kombination dieser Wirkung

eines nichtpathogenen *E. coli* mit den besonderen Eigenschaften des Nissle 1917 für dessen Therapieerfolg verantwortlich ist. So bieten dessen ausgesprochen günstige Stoffwechseleigenschaften ihm einen Selektionsvorteil im Ökosystem des Darms und schaffen damit überhaupt erst die Voraussetzung, das sich der Stamm dort etablieren kann [143]. *E. coli* Nissle 1917 besitzt in der Darmflora verschiedene Selektionsvorteile. Dazu gehört einerseits die Produktion von keimhemmenden bzw. –abtötenden Faktoren (Bakterizine, Mikroazine [143], kurzkettige Fettsäuren) gegen die er selber resistent ist. Andererseits zeichnet ihn eine bessere Versorgung mit essenziellen, potentiell knappen Wachstumsfaktoren wie  $\text{Fe}^{\text{III}}$  durch insgesamt fünf verschiedene Eisenaufnahmesysteme aus. [144]. Erst dadurch kann er andere Keime verdrängen und seine Wirkung entfalten.

Es ist also zu vermuten, dass es weniger eine einzelne spezifische Eigenschaft als die besondere Kombination der für *E. coli* Nissle 1917 typischen Eigenschaften (wie die Suppression der Zellzyklusprogression, das Schaffen eines bestimmten Zytokinprofils und die Stärkung der unspezifischen Immunabwehr) ist, die den Stamm von anderen *E. coli* abheben und seine Anwendung als Therapeutikum ermöglichen. Abgesehen davon ist EcN zur Zeit der einzige *E. coli* Stamm, der die anspruchsvollen Sicherheitsanforderungen erfüllt, die an ein Probiotikum bezüglich der Therapieerfahrung, Typisierung und genetischen Stabilität gestellt werden müssen [63].

#### **4.8 Zusammenfassung und Ausblick**

Obwohl das Probiotikum *E. coli* Nissle 1917 seit einigen Jahren erfolgreich in der Behandlung chronisch entzündlicher Darmerkrankungen angewendet wird, ist der zugrunde liegende Wirkmechanismus nur unzureichend geklärt. T-Zellen spielen bei der Regulation der intestinalen Immunhomöostase und Pathogenese von CED eine zentrale Rolle. Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es daher, den Einfluss von *E. coli* Nissle 1917 (ECN) auf das humane Immunsystem weitergehend zu charakterisieren.

In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein zellfreier bakterieller Überstand von *E. coli* Nissle 1917 (ECN-CM), nicht aber hitzeinaktivierte *E. coli* Nissle 1917 die Zellzyklusprogression und die Expansion von stimulierten, humanen peripheren T-Zellen in-vitro hemmt. Ursächlich hierfür konnten wir eine verminderte

Expression der Cykline A, B1, D2 und E mit einer konsekutiv verminderten Phosphorylierung des Retinoblastomproteins nachweisen. Wir konnten auch zeigen, dass periphere T-Zellen unter E. coli Nissle 1917 weniger proinflammatorische Zytokine wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezernieren, während die Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 durch EcN-CM heraufreguliert wird. Im Gegensatz zur potenten Beeinflussung des Zellzyklus, wurde die Apoptose von PBT durch E. coli Nissle 1917 nicht moduliert. Bei der Charakterisierung der biologischen Effekte von E. coli Nissle 1917 auf Lamina propria T-Zellen zeigte sich, dass im Gegensatz zu peripheren T-Zellen, die Zellzyklusprogression der ortsständigen T-Zellen durch EcN nicht beeinflusst wird. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen kommt es zu einer Rekrutierung und Aktivierung von peripheren T-Zellen in die intestinale Mukosa. Durch die differenzielle Beeinflussung des Immunsystems, bei der aktivierte periphere T-Zellen inhibiert, die ortsständigen T-Zellen jedoch in ihrer Funktion nicht gestört werden, könnte E. coli Nissle 1917 dazu beitragen, die mukosale Entzündungsreaktion zu limitieren, während die intestinale Immunhomöostase gewahrt bleibt.

Als wirksames Agens kommen kleine, hitzestabile bakterielle Produkte wie Lipopolysaccharide, bakterielle Lipoproteine, CPG-DNA, Lipoteichonsäuren und Peptidoglykane in Frage. Diese Substanzen, für die teilweise immunmodulatorische Effekte bekannt und die im EcN-CM nachweisbar sind, einzugrenzen und die beteiligten Rezeptoren aufzudecken ist gegenwärtig Ziel weiterer Untersuchungen. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit liefern weitere Hinweise, dass Probiotika einen breiten Einfluss auf das humane Immunsystem haben und decken zugrundeliegende Mechanismen auf.

## 5 LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Loftus, E. V., Jr. (2004): Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences, *Gastroenterology* (Band 126), Nr. 6, Seite 1504-1517. URL: PM:15168363
- [2] Tysk, C.; Lindberg, E.; Jarnerot, G. und Floderus-Myrhed, B. (1988): Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking, *Gut* (Band 29), Nr. 7, Seite 990-996. URL: PM:3396969
- [3] Fiocchi, C. (1998): Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis, *Gastroenterology* (Band 115), Nr. 1, Seite 182-205. URL: PM:9649475
- [4] Russell, R. K.; Wilson, D. C. und Satsangi, J. (2004): Unravelling the complex genetics of inflammatory bowel disease, *Archives of Disease in Childhood* (Band 89), Nr. 7, Seite 598-603. URL: <http://adc.bmjjournals.com/cgi/content/abstract/89/7/598>
- [5] Linskens, R. K.; Huijsdens, X. W.; Savelkoul, P. H.; Vandenbroucke-Grauls, C. M. und Meuwissen, S. G. (2001): The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics, *Scand.J Gastroenterol.Suppl*, Nr. 234, Seite 29-40. URL: PM:11768558
- [6] Swidsinski, A.; Ladhoff, A.; Pernthaler, A.; Swidsinski, S.; Loening-Baucke, V.; Ortner, M.; Weber, J.; Hoffmann, U.; Schreiber, S.; Dietel, M. und Lochs, H. (2002): Mucosal flora in inflammatory bowel disease, *Gastroenterology* (Band 122), Nr. 1, Seite 44-54.
- [7] Heddle, R. J. und Shearman, D. J. (1979): Serum antibodies to *Escherichia coli* in subjects with ulcerative colitis, *Clin.Exp.Immunol.* (Band 38), Nr. 1, Seite 22-30.
- [8] Hart, A. L.; Stagg, A. J.; Frame, M.; Graffner, H.; Glise, H.; Falk, P. und Kamm, M. A. (2002): The role of the gut flora in health and disease, and its modification as therapy, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band 16), Nr. 8, Seite 1383-1393. URL: PM:12182739
- [9] Boudeau, J.; Glasser, A. L.; Julien, S.; Colombel, J. F. und Darfeuille-Michaud, A. (2003): Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli*

- strains isolated from patients with Crohn's disease, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band 18), Nr. 1, Seite 45-56. URL: PM:12848625
- [10] Bernstein, C. N.; Blanchard, J. F.; Rawsthorne, P. und Collins, M. T. (2004): Population-based case control study of seroprevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in patients with Crohn's disease and ulcerative colitis, *J Clin.Microbiol.* (Band 42), Nr. 3, Seite 1129-1135. URL: PM:15004064
- [11] Hanauer, Stephen B. (2004): Medical therapy for ulcerative colitis 2004, *Gastroenterology* (Band 126), Nr. 6, Seite 1582-1592. URL: <http://www2.gastrojournal.orghttp://www2.gastrojournal.org/scripts/om.dll/serve?article=as0016508504004585>
- [12] Stange, E. F.; Schreiber, S.; Folsch, U. R.; von Herbay, A.; Scholmerich, J.; Hoffmann, J.; Zeitz, M.; Fleig, W. E.; Buhr, H. J.; Kroesen, A. J.; Moser, G.; Matthes, H.; Adler, G.; Reinshagen, M. und Stein, J. (2003): [Diagnostics and treatment of Crohn's disease -- results of an evidence-based consensus conference of the German Society for Digestive and Metabolic Diseases], *Z.Gastroenterol.* (Band 41), Nr. 1, Seite 19-20. URL: PM:12541167
- [13] Egan, L. J. und Sandborn, W. J. (2004): Advances in the treatment of Crohn's disease, *Gastroenterology* (Band 126), Nr. 6, Seite 1574-1581. URL: PM:15168368
- [14] Hoffmann, J. C.; Zeitz, M.; Bischoff, S. C.; Brambs, H. J.; Bruch, H. P.; Buhr, H. J.; Dignass, A.; Fischer, I.; Fleig, W.; Folsch, U. R.; Herrlinger, K.; Hohne, W.; Jantschek, G.; Kaltz, B.; Keller, K. M. ; Knebel, U.; Kroesen, A. J.; Kruis, W.; Matthes, H.; Moser, G.; Mundt, S.; Pox, C.; Reinshagen, M.; Reissmann, A.; Riemann, J.; Rogler, G.; Schmiegel, W.; Scholmerich, J.; Schreiber, S.; Schwandner, O.; Selbmann, H. K.; Stange, E. F.; Utzig, M. und Wittekind, C. (2004): [Diagnosis and therapy of ulcerative colitis: results of an evidence based consensus conference by the German society of Digestive and Metabolic Diseases and the competence network on inflammatory bowel disease], *Z.Gastroenterol.* (Band 42), Nr. 9, Seite 979-983. URL: PM:15455267
- [15] Lewis, J. D. (2003): How safe are the safest IBD drugs?, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 7, Seite 1986-1987. URL: PM:12806636



- [16] Jacobson, I. M.; Kelsey, P. B.; Blyden, G. T.; Demirjian, Z. N. und Isselbacher, K. J. (1985): Sulfasalazine-induced agranulocytosis, *Am.J Gastroenterol.* (Band 80), Nr. 2, Seite 118-121. URL: PM:2857524
- [17] Shanahan, F. (2004): Probiotics in inflammatory bowel disease--therapeutic rationale and role, *Adv.Drug Deliv.Rev.* (Band 56), Nr. 6, Seite 809-818. URL: PM:15063591
- [18] Kruis, W.; Schutz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G. und Stolte, M. (1997): Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band 11), Nr. 5, Seite 853-858. URL: PM:9354192
- [19] Kruis, W.; Fric, P.; Pokrotnieks, J.; Lukas, M.; Fixa, B.; Kascak, M.; Kamm, M. A.; Weismueller, J.; Beglinger, C.; Stolte, M.; Wolff, C. und Schulze, J. (2004): Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine, *Gut* (Band 53), Nr. 11, Seite 1617-1623. URL: <http://gut.bmjjournals.com/cgi/content/abstract/53/11/1617>
- [20] Rembacken, B. J.; Snelling, A. M.; Hawkey, P. M.; Chalmers, D. M. und Axon, A. T. (1999): Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial, *Lancet* (Band 354), Nr. 9179, Seite 635-639. URL: PM:10466665
- [21] Malchow, H. A. (1997): Crohn's disease and *Escherichia coli*. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?, *J Clin.Gastroenterol.* (Band 25), Nr. 4, Seite 653-658. URL: PM:9451682
- [22] Kuzela, L.; Kascak, M. und Vavrecka, A. (2001): Induction and maintenance of remission with nonpathogenic *Escherichia coli* in patients with pouchitis, *Am.J Gastroenterol.* (Band 96), Nr. 11, Seite 3218-3219. URL: PM:11721788
- [23] Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Helwig, U.; Venturi, A.; Lammers, K. M.; Brigidi, P.; Vitali, B.; Poggioli, G.; Miglioli, M. und Campieri, M. (2003): Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial, *Gastroenterology* (Band 124), Nr. 5, Seite 1202-1209. URL: PM:12730861
- [24] Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Venturi, A.; Brigidi, P.; Matteuzzi, D.; Bazzocchi, G.; Poggioli, G.; Miglioli, M. und Campieri, M. (2000): Oral bacteriotherapy as

- maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial, *Gastroenterology* (Band 119), Nr. 2, Seite 305-309. URL: PM:10930365
- [25] Venturi, A.; Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Johansson, R.; Zucconi, E.; Brigidi, P.; Matteuzzi, D. und Campieri, M. (1999): Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band 13), Nr. 8, Seite 1103-1108. URL: PM:10468688
- [26] Summers, R. W.; Elliott, D. E.; Urban, J. F., Jr.; Thompson, R. und Weinstock, J. V. (2005): Trichuris suis therapy in Crohn's disease, *Gut* (Band 54), Nr. 1, Seite 87-90. URL: <http://gut.bmjjournals.com/cgi/content/abstract/54/1/87>
- [27] Fuller, R. (1989): Probiotics in man and animals, *J Appl.Bacteriol.* (Band 66), Nr. 5, Seite 365-378. URL: PM:2666378
- [28] Isolauri, E.; Salminen, S. und Ouwehand, A. C. (2004): Microbial-gut interactions in health and disease. Probiotics, *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* (Band 18), Nr. 2, Seite 299-313. URL: PM:15123071
- [29] Shanahan, F. (2003): Probiotics: a perspective on problems and pitfalls, *Scand.J Gastroenterol.Suppl*, Nr. 237, Seite 34-36. URL: PM:12797679
- [30] Marteau, P. und Shanahan, F. (2003): Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects, *Best.Pract.Res.Clin.Gastroenterol.* (Band 17), Nr. 5, Seite 725-740. URL: PM:14507584
- [31] Goossens, D.; Jonkers, D.; Stobberingh, E.; van den, Bogaard A.; Russel, M. und Stockbrugger, R. (2003): Probiotics in gastroenterology: indications and future perspectives, *Scand.J Gastroenterol.Suppl*, Nr. 239, Seite 15-23. URL: PM:14743878
- [32] D'Souza, Aloysius L.; Rajkumar, Chakravarthi; Cooke, Jonathan und Bulpitt, Christopher J. (2002): Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis, *BMJ* (Band 324), Nr. 7350, Seite 1361. URL: <http://bmj.bmjjournals.com/cgi/content/abstract/324/7350/1361>

- [33] Cremonini, F.; Di Caro, S.; Nista, E. C.; Bartolozzi, F.; Capelli, G.; Gasbarrini, G. und Gasbarrini, A. (2002): Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea, *Aliment.Pharmacol.Ther.* (Band 16), Nr. 8, Seite 1461-1467. URL: PM:12182746
- [34] Mollenbrink, M. und Bruckschen, E. (1994): [Treatment of chronic constipation with physiologic *Escherichia coli* bacteria. Results of a clinical study of the effectiveness and tolerance of microbiological therapy with the *E. coli* Nissle 1917 strain (Mutaflor)], *Med.Klin.(Munich)* (Band 89), Nr. 11, Seite 587-593. URL: PM:7815986
- [35] Kalliomaki, M.; Salminen, S.; Poussa, T.; Arvilommi, H. und Isolauri, E. (2003): Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial, *Lancet* (Band 361), Nr. 9372, Seite 1869-1871. URL: PM:12788576
- [36] Fric, P. und Zavoral, M. (2003): The effect of non-pathogenic *Escherichia coli* in symptomatic uncomplicated diverticular disease of the colon, *Eur.J Gastroenterol.Hepatol.* (Band 15), Nr. 3, Seite 313-315. URL: PM:12610327
- [37] Tromm, A.; Niewerth, U.; Khoury, M.; Baestlein, E.; Wilhelms, G.; Schulze, J. und Stolte, M. (2004): The Probiotic *E. coli* Strain Nissle 1917 for the Treatment of Collagenous Colitis: First Results of an Open-Label Trial\*, *Z.Gastroenterol.* (Band 42), Nr. 5, Seite 365-369. URL: PM:15136935
- [38] Liu, Q.; Duan, Z. P.; Ha, da K.; Bengmark, S.; Kurtovic, J. und Riordan, S. M. (2004): Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis, *Hepatology* (Band 39), Nr. 5, Seite 1441-1449. URL: PM:15122774
- [39] Loguercio, C.; De Simone, T.; Federico, A.; Terracciano, F.; Tuccillo, C.; Di Chicco, M. und Carteni, M. (2002): Gut-liver axis: a new point of attack to treat chronic liver damage?, *Am.J Gastroenterol.* (Band 97), Nr. 8, Seite 2144-2146. URL: PM:12190198
- [40] LodInova-Zadnlkova, R.; Tlaskalova, H. und Bartakova, Z. (1991): The antibody response in infants after colonization of the intestine with *E. coli* O83. Artificial colonization used as a prevention against nosocomial infections, *Adv.Exp.Med.Biol.* (Band 310 ), Seite 329-335. URL: PM:1809007

- [41] Goerg, K. J. und Schlörer, E. (1998): [Probiotic therapy of pseudomembranous colitis. Combination of intestinal lavage and oral administration of *Escherichia coli*], Dtsch.Med.Wochenschr. (Band 123), Nr. 43, Seite 1274-1278. URL: PM:9817997
- [42] Henker, J.; Schuster, F. und Nissler, K. (2001): Successful treatment of gut-caused halitosis with a suspension of living non-pathogenic *Escherichia coli* bacteria--a case report, Eur.J Pediatr. (Band 160), Nr. 10, Seite 592-594. URL: PM:11686501
- [43] Hatakka, K.; Martio, J.; Korpela, M.; Herranen, M.; Poussa, T.; Laasanen, T.; Saxelin, M.; Vapaatalo, H.; Moilanen, E. und Korpela, R. (2003): Effects of probiotic therapy on the activity and activation of mild rheumatoid arthritis--a pilot study, Scand.J Rheumatol. (Band 32), Nr. 4, Seite 211-215. URL: PM:14626627
- [44] Reid, G. und Bocking, A. (2003): The potential for probiotics to prevent bacterial vaginosis and preterm labor, Am.J Obstet.Gynecol. (Band 189), Nr. 4, Seite 1202-1208. URL: PM:14586379
- [45] Naruszewicz, M.; Johansson, M. L.; Zapolska-Downar, D. und Bukowska, H. (2002): Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers, Am.J Clin.Nutr. (Band 76), Nr. 6, Seite 1249-1255. URL: PM:12450890
- [46] Steidler, L.; Hans, W.; Schotte, L.; Neirynck, S.; Obermeier, F.; Falk, W.; Fiers, W. und Remaut, E. (2000): Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10, Science (Band 289), Nr. 5483, Seite 1352-1355. URL: PM:10958782
- [47] Isolauri, E.; Sutas, Y.; Kankaanpää, P.; Arvilommi, H. und Salminen, S. (2001): Probiotics: effects on immunity, Am.J Clin.Nutr. (Band 73), Nr. 2 Suppl, Seite 444S -450S. URL: PM:11157355
- [48] Ichikawa, H.; Kuroiwa, T.; Inagaki, A.; Shineha, R.; Nishihira, T.; Satomi, S. und Sakata, T. (1999): Probiotic bacteria stimulate gut epithelial cell proliferation in rat, Dig.Dis.Sci. (Band 44), Nr. 10, Seite 2119-2123. URL: PM:10548366
- [49] Ishibashi, N. und Yamazaki, S. (2001): Probiotics and safety, Am.J Clin.Nutr. (Band 73), Nr. 2 Suppl, Seite 465S-470S. URL: PM:11157359

- [50] Adams, M. R. (1999): Safety of industrial lactic acid bacteria, J Biotechnol. (Band 68), Nr. 2-3, Seite 171-178. URL: PM:10194855
- [51] Simon, G. L. und Gorbach, S. L. (1995): Normal Alimentary Tract Microflora, Blaser, M. J.; Smith, P. D. und Ravdin, J. I., Infections of the Gastrointestinal Tract , Seite 53-69, Raven Press, New York.
- [52] Chaiken, B. H. (1994): Yogurt and autoimmune liver disease, Am.J Gastroenterol. (Band 89), Nr. 10, Seite 1916-1917. URL: PM:7942706
- [53] Mathurin, P.; Deng, Q. G.; Keshavarzian, A.; Choudhary, S.; Holmes, E. W. und Tsukamoto, H. (2000): Exacerbation of alcoholic liver injury by enteral endotoxin in rats, Hepatology (Band 32 ), Nr. 5, Seite 1008-1017. URL: PM:11050051
- [54] Lund, B. und Edlund, C. (2001): Probiotic Enterococcus faecium strain is a possible recipient of the vanA gene cluster, Clin.Infect.Dis. (Band 32), Nr. 9, Seite 1384-1385. URL: PM:11303279
- [55] Borriello, S. P.; Hammes, W. P. ; Holzapfel, W.; Marteau, P.; Schrezenmeir, J.; Vaara, M. und Valtonen, V. (2003): Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria, Clin.Infect.Dis. (Band 36), Nr. 6, Seite 775-780. URL: PM:12627362
- [56] Rautio, M.; Jousimies-Somer, H. ; Kauma, H.; Pietarinen, I.; Saxelin, M.; Tynkkynen, S. und Koskela, M. (1999): Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguishable from L. rhamnosus strain GG, Clin.Infect.Dis. (Band 28), Nr. 5, Seite 1159-1160. URL: PM:10452653
- [57] Mackay, A. D.; Taylor, M. B.; Kibbler, C. C. und Hamilton-Miller, J. M. (1999): Lactobacillus endocarditis caused by a probiotic organism, Clin.Microbiol.Infect. (Band 5), Nr. 5, Seite 290-292. URL: PM:11856270
- [58] Soleman, N.; Laferl, H.; Kneifel, W.; Tucek, G.; Budschedl, E.; Weber, H.; Pichler, H. und Mayer, H. K. (2003): How safe is safe?--a case of Lactobacillus paracasei ssp. paracasei endocarditis and discussion of the safety of lactic acid bacteria, Scand.J Infect.Dis. (Band 35), Nr. 10, Seite 759-762. URL: PM:14606618
- [59] Presterl, E.; Kneifel, W.; Mayer, H. K.; Zehetgruber, M.; Makristathis, A. und Graninger, W. (2001): Endocarditis by Lactobacillus rhamnosus due to yogurt

- ingestion?, Scand.J Infect.Dis. (Band 33), Nr. 9, Seite 710-714. URL: PM:11669233
- [60] Holzapfel, W. H.; Haberer, P.; Geisen, R.; Bjorkroth, J. und Schillinger, U. (2001): Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition, Am.J Clin.Nutr. (Band 73), Nr. 2 Suppl, Seite 365S-373S. URL: PM:11157343
- [61] Lherm, T.; Monet, C.; Nougier, B.; Soulier, M.; Larbi, D.; Le Gall, C.; Caen, D. und Malbrunot, C. (2002): Seven cases of fungemia with *Saccharomyces boulardii* in critically ill patients , Intensive Care Med. (Band 28), Nr. 6, Seite 797-801. URL: PM:12107689
- [62] Hennequin, C.; Kauffmann-Lacroix, C.; Jobert, A.; Viard, J. P.; Ricour, C.; Jacquemin, J. L. und Berche, P. (2000): Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia, Eur.J Clin.Microbiol.Infect.Dis. (Band 19), Nr. 1, Seite 16-20. URL: PM:10706174
- [63] Tschäppe, H (2001): Sicherheit mikrobieller Arzneimittel, Hacker, J und Kruis, W., Darmflora in Symbiose und Pathogenität , Seite 153-162, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen.
- [64] Salminen, S.; Bouley, C.; Boutron-Ruault, M. C.; Cummings, J. H.; Franck, A.; Gibson, G. R.; Isolauri, E.; Moreau, M. C.; Roberfroid, M. und Rowland, I. (1998): Functional food science and gastrointestinal physiology and function, Br.J Nutr. (Band 80 Suppl 1), Seite S147-S171. URL: PM:9849357
- [65] Köhler; Eggers; eischer; rre; ister und Iverer (2001), Medizinische Mikrobiologie , 8. Auflage, Seite 303-310, Urban & Fischer.
- [66] Masseret, E.; Boudeau, J.; Colombel, J. F.; Neut, C.; Desreumaux, P.; Joly, B.; Cortot, A. und Darfeuille-Michaud, A. (2001): Genetically related *Escherichia coli* strains associated with Crohn's disease, Gut (Band 48), Nr. 3, Seite 320-325.
- [67] Loew, D. (2001): Leben und Werk von Alfred Nissle, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Darmflora in Symbiose und Pathogenität , Seite 11-19, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen, ISBN: 3-00-008559-9.
- [68] Grozdanov, L.; Zahringer, U.; Blum-Oehler, G.; Brade, L.; Henne, A.; Knirel, Y. A.; Schombel, U.; Schulze, J.; Sonnenborn, U.; Gottschalk, G.; Hacker, J.;

- Rietschel, E. T. und Dobrindt, U. (2002): A single nucleotide exchange in the wzy gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of Escherichia coli strain Nissle 1917, J Bacteriol. (Band 184), Nr. 21, Seite 5912-5925. URL: PM:12374825
- [69] Blum-Oehler, G.; Oswald, S.; Eiteljorge, K.; Sonnenborn, U.; Schulze, J.; Kruis, W. und Hacker, J. (2003): Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic Escherichia coli strain Nissle 1917 in fecal samples, Res.Microbiol. (Band 154), Nr. 1, Seite 59-66. URL: PM:12576161
- [70] Grozdanov, Lubomir; Raasch, Carsten; Schulze, Jurgen; Sonnenborn, Ulrich; Gottschalk, Gerhard; Hacker, Jorg und Dobrindt, Ulrich (2004): Analysis of the Genome Structure of the Nonpathogenic Probiotic Escherichia coli Strain Nissle 1917, The Journal of Bacteriology (Band 186), Nr. 16, Seite 5432-5441. URL: <http://jb.asm.org/cgi/content/abstract/186/16/5432>
- [71] Stentebjerg-Olesen, B.; Chakraborty, T. und Klemm, P. (1999): Type 1 fimbriation and phase switching in a natural Escherichia coli fimB null strain, Nissle 1917, J Bacteriol. (Band 181), Nr. 24, Seite 7470-7478. URL: PM:10601203
- [72] Lodlnova-Zadnlkova, R. und Sonnenborn, U. (1997): Effect of preventive administration of a nonpathogenic Escherichia coli strain on the colonization of the intestine with microbial pathogens in newborn infants, Biol.Neonate (Band 71), Nr. 4, Seite 224-232. URL: PM:9129791
- [73] Hoffmann, R. M. und Kruis, W. (2002): [Probiotics and prebiotics--a renaissance?], Internist (Berl) (Band 43), Nr. 11, Seite 1400-1406. URL: PM:12524920
- [74] Stallmach, A. und Zeitz, M. (1999): Immunologie des Intestinaltraktes, Caspary, W. F. und Stein, J., Darmkrankheiten , Seite 55-61, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- [75] Xavier, R. J. und Podolsky, D. K. (2000): Microbiology. How to get along--friendly microbes in a hostile world, Science (Band 289), Nr. 5484, Seite 1483-1484. URL: PM:10991734
- [76] Wittig, B. M. und Zeitz, M. (2003): The gut as an organ of immunology, Int.J.Colorectal Dis. (Band 18), Nr. 3, Seite 181-187.

- [77] Elson, C. O.; Cong, Y.; Iqbal, N. und Weaver, C. T. (2001): Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma, *Semin.Immunol.* (Band 13), Nr. 3, Seite 187-194.
- [78] Tlaskalova-Hogenova, H.; Stepankova, R.; Hudcovic, T.; Tuckova, L.; Cukrowska, B.; Lodlnova-Zadnlkova, R.; Kozakova, H.; Rossmann, P.; Bartova, J.; Sokol, D.; Funda, D. P.; Borovska, D.; Rehakova, Z.; Sinkora, J.; Hofman, J.; Drastich, P. und Kokesova, A. (2004): Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases, *Immunol Lett.* (Band 93), Nr. 2-3, Seite 97-108. URL: PM:15158604
- [79] Groux, H. und Powrie, F. (1999): Regulatory T cells and inflammatory bowel disease, *Immunol Today* (Band 20), Nr. 10, Seite 442-445. URL: PM:10500290
- [80] Neish, A. S.; Gewirtz, A. T.; Zeng, H.; Young, A. N.; Hobert, M. E.; Karmali, V.; Rao, A. S. und Madara, J. L. (2000): Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of IkappaB-alpha ubiquitination, *Science* (Band 289), Nr. 5484, Seite 1560-1563. URL: PM:10968793
- [81] Levine, A. D. und Fiocchi, C. (2001): Regulation of life and death in lamina propria T cells, *Semin.Immunol* (Band 13), Nr. 3, Seite 195-199. URL: PM:11394962
- [82] Lenardo, M.; Chan, K. M.; Hornung, F.; McFarland, H.; Siegel, R.; Wang, J. und Zheng, L. (1999): Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment, *Annu.Rev.Immunol* (Band 17), Seite 221-253. URL: PM:10358758
- [83] Neurath, M. F.; Finotto, S.; Fuss, I.; Boirivant, M.; Galle, P. R. und Strober, W. (2001): Regulation of T-cell apoptosis in inflammatory bowel disease: to die or not to die, that is the mucosal question, *Trends Immunol* (Band 22), Nr. 1, Seite 21-26. URL: PM:11286687
- [84] Duchmann, R.; Kaiser, I.; Hermann, E.; Mayet, W.; Ewe, K. und Meyer zum Buschenfelde, K. H. (1995): Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease (IBD), *Clin.Exp.Immunol* (Band 102), Nr. 3, Seite 448-455. URL: PM:8536356



- [85] Sturm, A.; Itoh, J.; Jacobberger, J. W. und Fiocchi, C. (2002): p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling, *J.Clin.Invest* (Band 109), Nr. 11, Seite 1481-1492. URL: PM:12045262
- [86] Yan, F. und Polk, D. B. (2002): Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells, *Journal of Biological Chemistry* (Band 277), Nr. 52, Seite 50959-50965. URL: PM:12393915
- [87] Weiss, A. (1993): T Lymphocyte Activation, Paul, W. E., *Fundamental Immunology*, 3rd Edition. Auflage, Seite 467-504, Raven Press, New York.
- [88] Begg, A. C.; McNally, N. J.; Shrieve, D. C. und Karcher, H. (1985): A method to measure the duration of DNA synthesis and the potential doubling time from a single sample, *Cytometry* (Band 6), Seite 620-626.
- [89] White, R. A.; Meistrich, M. L.; Pollack, A. und Terry, N. H. (2000): Simultaneous estimation of T(G2+M), T(S), and T(pot) using single sample dynamic tumor data from bivariate DNA-thymidine analogue cytometry, *Cytometry* (Band 41), Seite 1-8.
- [90] Vermes, I.; Haanen, C.; Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995): A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V, *J Immunol Methods* (Band 184), Nr. 1, Seite 39-51. URL: PM:7622868
- [91] Pozarowski, P. und Darzynkiewicz, Z. (2004): Analysis of cell cycle by flow cytometry, *Methods Mol.Biol.* (Band 281), Seite 301-311. URL: PM:15220539
- [92] Darzynkiewicz, Z.; Bedner, E. und Smolewski, P. (2001): Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis, *Semin.Hematol.* (Band 38), Nr. 2, Seite 179-193. URL: PM:11309699
- [93] Darzynkiewicz, Z.; Gong, J.; Juan, G.; Ardelt, B. und Traganos, F. (1996): Cytometry of cyclin proteins, *Cytometry* (Band 25), Nr. 1, Seite 1-13. URL: PM:8875049
- [94] Hollingsworth, R. E., Jr.; Chen, P. L. und Lee, W. H. (1993): Integration of cell cycle control with transcriptional regulation by the retinoblastoma protein, *Curr.Opin.Cell Biol.* (Band 5), Nr. 2, Seite 194-200. URL: PM:8507491

- [95] West, G. A.; Matsuura, T.; Levine, A. D; Klein, J. S. und Fiocchi, C. (1996): Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity, *Gastroenterology* (Band 110), Seite 1683-1695.
- [96] Huang, S. und Ingber, D. E. (1999): The structural and mechanical complexity of cell-growth control, *Nat.Cell Biol.* (Band 1), Nr. 5, Seite E131-E138. URL: PM:10559956
- [97] Sturm, A. und Fiocchi, C. (2002): Life and death in the gut: more killing, less Crohn's, *Gut* (Band 50), Nr. 2, Seite 148-149. URL: PM:11788550
- [98] Altenhoefer, A.; Oswald, S.; Sonnenborn, U.; Enders, C.; Schulze, J.; Hacker, J. und Oelschlaeger, T. A. (2004): The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens, *FEMS Immunol Med.Microbiol.* (Band 40), Nr. 3, Seite 223-229. URL: PM:15039098
- [99] Schultz, M.; Strauch, U. G.; Linde, H. J.; Watzl, S.; Obermeier, F.; Gottl, C.; Dunger, N.; Grunwald, N.; Scholmerich, J. und Rath, H. C. (2004): Preventive effects of *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on acute and chronic intestinal inflammation in two different murine models of colitis, *Clin.Diagn.Lab Immunol* (Band 11), Nr. 2, Seite 372-378. URL: PM:15013990
- [100] Wehkamp, Jan; Harder, Jurgen; Wehkamp, Kai; Meissner, Birte Wehkamp-von; Schlee, Miriam; Enders, Corinne; Sonnenborn, Ulrich; Nuding, Sabine; Bengmark, Stig; Fellermann, Klaus; Schroder, Jens Michael und Stange, Eduard F. (2004): NF- $\kappa$ B- and AP-1-Mediated Induction of Human Beta Defensin-2 in Intestinal Epithelial Cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a Novel Effect of a Probiotic Bacterium, *Infection and Immunity* (Band 72), Nr. 10, Seite 5750-5758. URL: <http://iai.asm.org/cgi/content/abstract/72/10/5750>
- [101] Hockertz, S. (1997): Augmentation of host defence against bacterial and fungal infections of mice pretreated with the non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917, *Arzneimittelforschung.* (Band 47), Nr. 6, Seite 793-796. URL: PM:9239462
- [102] Karin, M. und Ben Neriah, Y. (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity, *Annu.Rev.Immunol* (Band 18), Seite 621-663 . URL: PM:10837071

- [103] Pessi, T.; Sutas, Y.; Saxelin, M.; Kallioinen, H. und Isolauri, E. (1999): Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria, *Appl.Environ.Microbiol.* (Band 65), Nr. 11, Seite 4725-4728. URL: PM:10543777
- [104] Lammers, K. M.; Helwig, U.; Swennen, E.; Rizzello, F.; Venturi, A.; Caramelli, E.; Kamm, M. A.; Brigidi, P.; Gionchetti, P. und Campieri, M. (2002): Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells, *Am.J Gastroenterol.* (Band 97), Nr. 5, Seite 1182-1186. URL: PM:12014725
- [105] Cross, M. L.; Ganner, A.; Teilab, D. und Fray, L. M. (2004): Patterns of cytokine induction by gram-positive and gram-negative probiotic bacteria, *FEMS Immunol Med.Microbiol.* (Band 42), Nr. 2, Seite 173-180. URL: PM:15364101
- [106] Eberl, M.; Hintz, M.; Reichenberg, A.; Kollas, A. K.; Wiesner, J. und Jomaa, H. (2003): Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation, *FEBS Lett.* (Band 544), Nr. 1-3, Seite 4-10. URL: PM:12782281
- [107] Cross, M. L. (2002): Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens, *FEMS Immunol Med.Microbiol.* (Band 34), Nr. 4, Seite 245-253. URL: PM:12443824
- [108] Vaux, D. L. und Korsmeyer, S. J. (1999): Cell death in development, *Cell* (Band 96), Nr. 2, Seite 245-254. URL: PM:9988219
- [109] King, K. L. und Cidlowski, J. A. (1995): Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death, *J Cell Biochem.* (Band 58), Nr. 2, Seite 175-180. URL: PM:7673325
- [110] Hengartner, M. O. (2000): The biochemistry of apoptosis, *Nature* (Band 407), Nr. 6805, Seite 770-776. URL: PM:11048727
- [111] Lenardo, M. J. (1997): The molecular regulation of lymphocyte apoptosis, *Semin.Immunol.* (Band 9), Nr. 1, Seite 1-5.
- [112] Targan, S. R.; Hanauer, S. B.; van Deventer, S. J.; Mayer, L.; Present, D. H.; Braakman, T.; DeWoody, K. L.; Schaible, T. F. und Rutgeerts, P. J. (1997): A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor

- alpha for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group, N.Engl.J Med. (Band 337), Nr. 15, Seite 1029-1035. URL: PM:9321530
- [113] Luger, A.; Schmidt, M.; Luger, N.; Pauels, H. G.; Domschke, W. und Kucharzik, T. (2001): Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway, Gastroenterology (Band 121), Nr. 5, Seite 1145-1157 .
- [114] ten Hove, T.; van Montfrans, C.; Peppelenbosch, M. P. und van Deventer, S. J. (2002): Infliximab treatment induces apoptosis of lamina propria T lymphocytes in Crohn's disease, Gut (Band 50), Nr. 2, Seite 206-211.
- [115] Keane, J.; Gershon, S.; Wise, R. P.; Mirabile-Levens, E.; Kasznica, J.; Schwiertman, W. D.; Siegel, J. N. und Braun, M. M. (2001): Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent, N.Engl.J.Med. (Band 345), Nr. 15, Seite 1098-1104.
- [116] Esteve, M.; Saro, C.; Gonzalez-Huix, F.; Suarez, F.; Forne, M. und Viver, J. M. (2004): Chronic hepatitis B reactivation following infliximab therapy in Crohn's disease patients: need for primary prophylaxis, Gut (Band 53), Nr. 9, Seite 1363-1365. URL: PM:15306601
- [117] Keating, G. M. und Perry, C. M. (2002): Infliximab: an updated review of its use in Crohn's disease and rheumatoid arthritis, BioDrugs. (Band 16), Nr. 2, Seite 111-148. URL: PM:11985485
- [118] Khanna, D.; McMahon, M. und Furst, D. E. (2004): Safety of tumour necrosis factor-alpha antagonists, Drug Saf (Band 27), Nr. 5, Seite 307-324. URL: PM:15061685
- [119] James, S. P. und Kiyono, H. (1999): Gastrointestinal Lamina Propria T cells, Ogra, P.; Mestecky, J.; Lamm, M.; Strober, W.; Bienenstock, S. und McGhee, J. R., Mucosal Immunology , Seite 181-396, Academic Press, New York.
- [120] Schieferdecker, H. L.; Ullrich, R.; Hirsland, H. und Zeitz, M. (1992): T cell differentiation antigens on lymphocytes in the human intestinal lamina propria, The Journal of Immunology (Band 149), Nr. 8, Seite 2816-2822. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/149/8/2816>

- [121] Zeitz, M.; Ullrich, R.; Schneider, T.; Schieferdecker, H. L. und Riecken, E. O. (1994): Cell differentiation and proliferation in the gastrointestinal tract with respect to the local immune system, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* (Band 733), Seite 75-86. URL: PM:7978905
- [122] Burgio, V. L.; Fais, S.; Boirivant, M.; Perrone, A. und Pallone, F. (1995): Peripheral monocyte and naive T-cell recruitment and activation in Crohn's disease, *Gastroenterology* (Band 109), Nr. 4, Seite 1029-1038. URL: PM:7557067
- [123] Ambrose, N. S.; Johnson, M.; Burdon, D. W. und Keighley, M. R. (1984): Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crohn's disease surgery, *Br.J.Surg.* (Band 71), Nr. 8, Seite 623-625.
- [124] Kirjavainen, P. V.; El Nezami, H. S.; Salminen, S. J.; Ahokas, J. T. und Wright, P. F. (1999): The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation, *FEMS Immunol Med.Microbiol.* (Band 26), Nr. 2, Seite 131-135. URL: PM:10536299
- [125] Graves, J. D.; Downward, J.; Izquierdo-Pastor, M.; Rayter, S.; Warne, P. H. und Cantrell, D. A. (1992): The growth factor IL-2 activates p21ras proteins in normal human T lymphocytes, *The Journal of Immunology* (Band 148), Nr. 8, Seite 2417-2422. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/148/8/2417>
- [126] Sands, B. E. (1999): Novel therapies for inflammatory bowel disease, *Gastroenterol.Clin.North Am.* (Band 28), Nr. 2, Seite 323-351. URL: PM:10372271
- [127] Strobel, S. und Mowat, A. M. (1998): Immune responses to dietary antigens: oral tolerance, *Immunol Today* (Band 19), Nr. 4, Seite 173-181. URL: PM:9577094
- [128] Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G. (1997): A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, *Nature* (Band 389), Nr. 6652, Seite 737-742. URL: PM:9338786
- [129] Santin, A. D.; Hermonat, P. L. ; Ravaggi, A.; Bellone, S.; Pecorelli, S.; Roman, J. J.; Parham, G. P. und Cannon, M. J. (2000): Interleukin-10 increases Th1 cytokine production and cytotoxic potential in human papillomavirus-specific

- CD8(+) cytotoxic T lymphocytes, J Virol. (Band 74), Nr. 10, Seite 4729-4737.  
URL: PM:10775611
- [130] Furukawa, Yutaka; Becker, Gerold; Stinn, Jennifer L.; Shimizu, Koichi; Libby, Peter und Mitchell, Richard N. (1999): Interleukin-10 (IL-10) Augments Allograft Arterial Disease : Paradoxical Effects of IL-10 in Vivo, American Journal of Pathology (Band 155), Nr. 6, Seite 1929-1939. URL: <http://ajp.amjpathol.org/cgi/content/abstract/155/6/1929>
- [131] Madsen, K. L. (2001): Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse, Clin.Invest Med. (Band 24), Nr. 5, Seite 250-257. URL: PM:11603509
- [132] Stokkers, P. C. und Hommes, D. W. (2004): New cytokine therapeutics for inflammatory bowel disease, Cytokine (Band 28), Nr. 4-5, Seite 167-173. URL: PM:15588691
- [133] de Villiers, W. J. (2003): Crohn's disease and IL-10 therapy: promise regained, Inflamm.Bowel.Dis. (Band 9), Nr. 3, Seite 210-211. URL: PM:12797349
- [134] Girardin, S. E. und Philpott, D. J. (2004): Mini-review: the role of peptidoglycan recognition in innate immunity, Eur.J Immunol (Band 34), Nr. 7, Seite 1777-1782. URL: PM:15214025
- [135] Ulmer, A. J.; Flad, H.; Rietschel, T. und Mattern, T. (2000): Induction of proliferation and cytokine production in human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS), Toxicology (Band 152), Nr. 1-3, Seite 37-45. URL: PM:11090938
- [136] Krieg, Arthur M. (2002): CPG MOTIFS IN BACTERIAL DNA AND THEIR IMMUNE EFFECTS, Annual Review of Immunology (Band 20), Nr. 1, Seite 709-760. URL: <http://arjournals.annualreviews.org/loi/immunol>
- [137] Gelman, Andrew E.; Zhang, Jidong; Choi, Yongwon und Turka, Laurence A. (2004): Toll-Like Receptor Ligands Directly Promote Activated CD4+ T Cell Survival, The Journal of Immunology (Band 172), Nr. 10, Seite 6065-6073. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/172/10/6065>
- [138] Sherr, C. J. (1994): G1 phase progression: cycling on cue, Cell (Band 79), Nr. 4, Seite 551-555.

- [139] Lammers, K. M.; Brigidi, P.; Vitali, B.; Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Caramelli, E.; Matteuzzi, D. und Campieri, M. (2003): Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells, *FEMS Immunol Med.Microbiol.* (Band 38), Nr. 2, Seite 165-172. URL: PM:13129651
- [140] Sieling, Peter A.; Chung, Woosin; Duong, Baochau T.; Godowski, Paul J. und Modlin, Robert L. (2003): Toll-Like Receptor 2 Ligands as Adjuvants for Human Th1 Responses, *The Journal of Immunology* (Band 170), Nr. 1, Seite 194-200. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/170/1/194>
- [141] Mokuno, Y.; Matsuguchi, T.; Takano, M.; Nishimura, H.; Washizu, J.; Ogawa, T.; Takeuchi, O.; Akira, S.; Nimura, Y. und Yoshikai, Y. (2000): Expression of toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by *Escherichia coli* infection in mice, *The Journal of Immunology* (Band 165), Nr. 2, Seite 931-940. URL: PM:10878368
- [142] Power, Colm P.; Wang, Jiang H. ; Manning, Brian; Kell, Malcolm R. ; Aherne, Noel F.; Wu, Qiong D. und Redmond, H. Paul (2004): Bacterial Lipoprotein Delays Apoptosis in Human Neutrophils through Inhibition of Caspase-3 Activity: Regulatory Roles for CD14 and TLR-2, *The Journal of Immunology* (Band 173), Nr. 8, Seite 5229-5237. URL: <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/173/8/5229>
- [143] Hacker, J; Dobrindt, U und Emödy, L (2001): Wie Bakterien kommunizieren. quorum sensing und Crosstalk in bakteriellen Lebensgemeinschaften, Hacker, J und Kruis, W., *Darmflora in Symbiose und Pathogenität* , Seite 73-81, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen.
- [144] Heesemann, J. und Schubert, S. (2001): Antagonistische Prinzipien der Eisentransportsysteme von *E.coli*, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., *Darmflora in Symbiose und Pathogenität* , Seite 65-72, Alfred-Nissle-Gesellschaft e.V., Hagen, ISBN: 3-00-008559-9.

## 6 VERÖFFENTLICHUNGEN

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsarbeit waren Bestandteil der folgenden Veröffentlichung:

- Sturm A, Rilling K, Baumgart DC, Gargas K, Abou-Ghazalé T, Raupach B, Eckert J, Schumann RR, Enders C, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Dignass AU. *Escherichia coli* Nissle distinctively modulates T Cell Cycling and Expansion via Toll-Like Receptor 2 Signaling. *Infect Immunity* 2005; 75; 3

Teile der vorliegenden Ergebnisse sind zudem vorab als Kongressposter präsentiert worden:

- Sturm A, Rilling K, Harder d'Heureuse J, Wiedenmann B, Dignass AU. Dual Function of the probiotic *E. coli* strain Nissle 1917: Inhibition of Cell Cycle Progression of Peripheral T cells and Pro-Apoptotic for Mucosal T Cells. *Gastroenterology* 2003; 124; A155
- Rilling K, Harder d'Heureuse J, Sturm A et al. Probiotic *E.coli* Strain Nissle 1917 inhibits Cell Cycle Progression and Expansion of Peripheral Blood but not Mucosal T-Cells. *Falk-Kongress 2003, Berlin*.
- Rilling K, Abou-Ghazalé T, Scherer R, Harder d'Heureuse J, Wiedenmann B, Dignass AU, Sturm A. *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibiert die Zellzyklusprogression peripher, nicht aber mukosaler T-Zellen. *Z Gastroenterol* 8/2003; p697-900 P38
- Sturm A, Rilling K, Harder d'Heureuse J, Baumgart D, Wiedenmann B, Dignass AU. Probiotic *E. coli* Nissle 1917 (EcN) inhibits activation and adhesion of peripheral T-cells to extracellular matrix. *Gastroenterology* 2004; 126, Suppl 2; A578



# LEBENS LAUF

**Klaus Ulrich Rilling**

**Zur Person:** geboren am 28.5.1975 in Hamburg  
Familienstand: ledig  
wohnhafte: Metzger Str. 18 10405 Berlin  
Telefon: +49 (0)30 40301168  
Email: [k.rilling@o2online.de](mailto:k.rilling@o2online.de)

## **Schulbildung & Berufstätigkeit:**

- 1981 – 95: Grundschule und Gymnasium, Abitur am Gymnasium Hamburg-Blankenese mit Durchschnittsnote 2,1
- 1995 – 97: Studium der Elektrotechnik an der Technischen Universität Hamburg-Harburg
- 8/1997 – 9/1998: Während der Wartezeit auf die Zulassung zum Medizinstudium durch die ZVS: zunächst orientierende Praktika, dann Rettungssanitäterlehrgang an der DRK-Landesschule Hamburg mit Anästhesiepraktikum am Krankenhaus Tabea, Hamburg (Chefarzt: Dr. Lohmann)
- 10/1998 – 4/1999: Hauptamtlich Angestellter bei der Firma Paramedic Hamburg als Rettungssanitäter

## **Medizinstudium:**

- 4/1999: Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der Freien Universität Berlin, seitdem wiederholte Beschäftigung als Rettungssanitäter auf Rettungs- und Notarztwagen der DRK-Rettungswache Kaltenkirchen, Landkreis Bad Segeberg
- 4/2001: Ärztliche Vorprüfung, Durchschnittsnote 1,66, Wechsel an die Humboldt-Universität zu Berlin
- 3/2002: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Durchschnittsnote 2,1
- 4/2004: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Durchschnittsnote 2,33
- 6/2005: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Approbation, Gesamtnote 2

***Famulaturen:***

- 9 – 10/2001: III. Med. Abteilung – Kardiologie des Allgemeinen  
Krankenhauses Altona, Hamburg (Chefarzt: Prof. Dr. K. E. von  
Ohlshausen)
- 8 – 10/2002: Medizinische Klinik m. S. Hepatologie und Gastroenterologie  
Charité –Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow Klinikum  
(Direktor: Prof. Dr. B. Wiedenmann)
- 9/2003: Allgemeinarztpraxis Dr. Alscher, Bad Freienwalde

***Praktisches Jahr:***

- 4 – 8/2004: Innere Medizin an der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Virchow Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt  
Nephrologie (Direktor: Prof. Dr. U. Frei)
- 8 – 12/2004: Wahlfach Urologie an der Charité – Universitätsmedizin Berlin  
Campus Mitte, Klinik für Urologie (Direktor: Prof. Dr. S.  
Loehning)
- 12/2004 – 3/2005: Chirurgie an der Chirurgischen Klinik der Parkklinik Berlin  
Weissensee (Chefarzt: PD Dr. G. Arlt)

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die meine Arbeit unterstützt und möglich gemacht haben. An erster Stelle waren dies mein Doktorvater Herr Prof. Dr. med. Dignass und mein wissenschaftlicher Betreuer Herr PD Dr. med Sturm, in deren Labor und unter deren Anleitung diese Arbeit entstand. Beide förderten meine wissenschaftliche Arbeit, waren für mich jederzeit erreichbar und ermöglichten mir außerdem mehrfach die Publikation der Ergebnisse. Weiterhin danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Mukosaimmunologie an der Medizinischen Klinik m.S. Hepatologie und Gastroenterologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum. In außerordentlichem Maße haben Fr. Johanna Harder-D’Heureuse und Fr. Diana Metzke als kompetente Ansprechpartner bei jeder Art von Laborproblemen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Ich bedanke mich außerdem beim Personal der Operationssäle und bei meiner Mitdotorandin Janina Barth für die kollegiale Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und der Familie B. und N. Becker, die mein Studium ermöglicht und in jeglicher Weise unterstützt haben. Weiterhin danke ich meinen Geschwistern sowie allen Freunden, Bekannten und Komilitonen, die mit unverzichtbaren Tips und gelegentlicher Ablenkung bewirkt haben, dass ich nicht den Spaß am Studium und an der Promotion verloren habe.

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, Klaus Ulrich Rilling, dass die vorgelegte Promotionsarbeit mit dem Titel: "Beeinflussung der Apoptoserate und Zellzyklusprogression humaner T-Zellen durch den probiotischen E. coli Stamm Nissle 1917" von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar, auch nicht in Teilen. Die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur sind in ihr vollständig angegeben, es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwandt. Das beantragte Promotionsverfahren stellt das erste beantragte Promotionsverfahren dar.

Berlin, 06.07.2005